



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen



FI0001015148

(12) PATENTTIJULKAISU  
PATENTSKRIFT

(10) FI 101514 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.07.98

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

A 23J 1/20, 3/08, A 23C 21/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 944110

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 07.09.94

(24) Alkupäivä - Löpdag 07.09.94

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 24.08.95

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

23.02.94 FI 940846 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Savolainen, Jouko, Kuurinniityntie 26, 02700 Kauniainen, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Savolainen, Jouko, Kuurinniityntie 26, 02700 Kauniainen, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab, Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi  
Förfarande för isolering av vassleproteiner

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Journal of Food Science, vol. 55, nro 6, 1990, J.M.Gonzalez et al.,  
"Recovery of Proteins from Sweet Whey Using a solid State Sulfitolysis", p. 1559-1563

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee prosessia ja laitteistoa heraproteiinien eristämiseksi. Prosessi sisältää vaiheet, joissa

a) suoritetaan heran esikäsittely, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen vedestä,

b) suoritetaan vaiheen a) esikäsitellyn heran sulfonointikäsittely, jossa esikäsitelty hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa oleellisesti ilman katalyysaattoria ja heran proteiinit sulfonoituvat, ja

c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsitellyn heran loppukäsittely, joka ainakin käsittää heran sulfonoitujen proteiinien erottamisen em. käsitellystä herasta.

Laitteisto käsittää

a) heran syöttö- ja esikäsittelylaitteet, jotka käsittävät heran konsentrointilaitteen (6, 7),

b) proteiinien sulfonointikäsitelylaitteet, jotka käsittävät

b<sub>1</sub>) sulfonointireaktorin (4, 5),

b<sub>2</sub>) sulfiitin annostelulaitteen (A) ja

b<sub>3</sub>) elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen annostelulaitteen (B), joilla molemmilla annostelulaitteilla (A, B) on yhteys sulfonointireaktoriin (4, 5),

c) sulfonoitujen proteiinien jälkikäsitelylaitteet, jotka käsittävät sulfonoitujen proteiinien erotus- ja talteenotto-laitteet (mm. 10, 13, 14, 15), ja

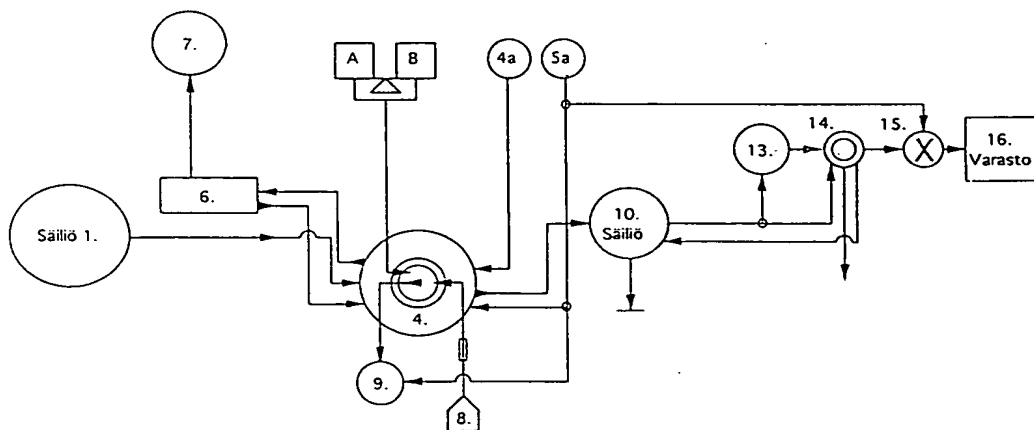
d) johdot kohdan a) heran syöttö- ja esikäsittelylaitteiden (6, 7) ja kohdan b) proteiinien sulfonointilaitteiden (4, 5) välillä sekä kohdan b) proteiinien sulfonointilaitteiden (4, 5) ja kohdan c) sulfonoitujen proteiinien jälkikäsitelylaitteiden (mm. 10, 13, 14, 15) välillä.

Uppfinningen avser en process och en apparatur för isolering av proteiner ur vassla. Processen innehåller stegen, där

- a) vasslan förbehandlas, vilket åtminstone innefattar koncentrerings av vasslan genom avlägsning av 75-95 % av dess vatten,
- b) den förbehandlade vasslan ur steg a) sulfoneringsbehandlas, varvid den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfid och en oxiderande förening av livsmedelskvalitet utan katalysator och vasslans proteiner sulfoneras, och
- c) den för- och sulfoneringsbehandlade vasslan ur steg b) slutbehandlas, varvid vasslans sulfonerade proteiner åtminstone separeras ur ovanstående behandlade vassla.

Apparaturen innefattar

- a) tillförsel- och förbehandlingsapparater för vasslan, vilka innefattar en koncentreringsapparat (6, 7) för vasslan,
- b) proteinsulfoneringsapparater, som innefattar
  - b<sub>1</sub>) en sulfoneringsreaktor (4, 5),
  - b<sub>2</sub>) en sulfid doseringsapparat (A) och
  - b<sub>3</sub>) en doseringsapparat (B) för den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet, vilka bägge doseringsapparater (A, B) är förenade med sulfoneringsreaktorn (4, 5),
- c) efterbehandlingsapparater för de sulfonerade proteinerna, vilka efterbehandlingsapparater innefattar separerings- och tillvaratagningsapparater (bl.a. 10, 13, 14, 15) för de sulfonerade proteinerna, och
- d) ledningar mellan matnings- och förbehandlingsapparaterna (6, 7) för vasslan i punkt a) och sulfoneringsapparaterna (4, 5) för proteinerna i punkt b) samt mellan sulfoneringsapparaterna (4, 5) för proteinerna i punkt b) och efterbehandlingsapparaterna (bl.a. 10, 13, 14, 15) för de sulfonerade proteinerna i punkt c).



## Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi

- Keksintö koskee prosessia pääasiassa vettä, laktoosia ja proteiineja sisältävän heran proteiinien eristämiseksi, joka sisältää vaiheet, joissa
- 5 a) suoritetaan heran esikäsitteleminen, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen vedestä,
  - b) suoritetaan vaiheen a) esikäsitellyn heran sulfonointikäsitteleminen, ja
  - c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsitellyn heran loppukäsittely, joka
  - 10 ainakin käsittää heran sulfonoitujen proteiinien erottamisen em. käsitelystä herasta konsentroimalla ne, saostamalla ne ja/tai suorittamalla niille fraktiosaostus.

Heraproteiinit ovat muihin ravintoproteiineihin nähden täysin ylivoimaisia, mitä tulee niiden ravintoarvoon ja erityisesti lysiini- ja metioniinipitoisuuteen. Heraproteiinien talteenotto ja käyttö ihmisravinnossa vähentäisi myös juustontuotannon kustannuksia.

- 15 Vaikka heraproteiinin käytöllä on potentiaalia ihmisravintona, pääesteet näyttäivät tällä hetkellä olevan (1) sen talteenottoprosessin ja eri komponenttien erotusprosessin kalleus ja (2) konsentraatin tai isolaatin huonot funktionaaliset ominaisuudet, kuten huono liukoisuus, emulgointikyky, geelinmuodostuskyky ja vaahdonmuodostuskyky.

- 20 Heran proteiinien eristystä vaikeuttaa niiden hyvä liukoisuus eikä siihen voida vaikuttaa pH:n muutoksella välillä pH 2-9 proteiinien ollessa natiivissa muodossa. Proteiini-  
 en eristys tapahtuu neljän päämenetelmän mukaisesti: 1. denaturointi ja saostus, 2. ultrasuodatus, 3. ioninvaihto ja 4. kemiallinen muuntelu ja saostus.

- 25 Yleisimmin tunnettu menetelmä heraproteiinien eristämiseksi on denaturointi eli kuumennus ja pH:n laskeminen happamalle puolelle. Eristys on suoritettavissa taloudellisesti esimerkiksi seuraavasti: hera konsentroidaan noin 20 %:n kuiva-ainepitoisuuteen, pH säädetään välille 6,0-7,0, proteiinit denaturoidaan pitämällä lämpötila 90°C:n yläpuolella 10-30 min, minkä jälkeen proteiinit saostetaan laskemalla pH 4,4-5,0:aan. Tu-  
 30 loksena saatu proteiini on menettänyt lähes kaikki tärkeimmistä em. funktionaalisista ominaisuuksistaan. Sitä käytetään pääasiassa erilaisissa levitteissä, esimerkiksi sulatejuustoissa, osittain tai kokonaan korvaamaan juusto. Hill, *et al.*, Can. Int. Food Sci. Technol. J. 15, (1982) 155-160.

- 35 Nykyään heran proteiinit eristetään pääasiassa proteiinkonsentraattina ultrasuodattamalla ja kuivaamalla tai proteiini-isolaattina käyttämällä ioninvaihtoadsorptiotekniikkaa ja kuivaamalla. Molemmilla menetelmillä on mahdollista saada eristetyt proteiinit funktionaalisina. Määräävänä tekijänä näidenkin tuotantomenetelmien valinnassa on tuotteen funktionaalisuus ja sen tuotantokustannukset.

Proteiinikonsentraattien koostumuksessa, funktionaalisuudessa sekä aistittavissa ominaisuuksissa esiintyy suurta vaihtelua ja sen vuoksi teollisuus vieroksuu niiden käyttöä. Vaihtelu johtuu herän erilaisesta koostumuksesta ja esikäsittelyn sekä valmistus- ja käsittelyolosuhteiden erilaisuudesta.

5

Proteiini-isolaateissakin esiintyy edellä mainituista syistä eri ominaisuuksien vaihtelua. Ioninvaihtoadsorptiomenetelmä niiden valmistamiseksi tasaa vaihtelua jonkin verran ja antaa koostumukseltaan erilaisen lopputuotteen kuin mitä proteiinikonsentraatti on.

- 10 Julkaisun Morr ja Foegeding, Food Technol. 44 (1990) 100-112, mukaisen aineiston, jossa oli kolme heraproteiini-isolaattia ja kahdeksan konsentraattia, analyysi osoitti näiden eroavan selvästi koostumukseltaan. Konsentraattien ja isolaattien koostumuksen keskimääräiset arvot olivat vastaavasti seuraavat: proteiinipitoisuus 73,8 ja 91,0 %, ei-proteiinityppi 3,10 ja 0,32 %, vesi 5,13 ja 3,75 %, tuhka 4,27 ja 1,82 %, laktoosi 3,92 ja 0,57 % sekä rasva 5,00 ja 0,57 %.

15

Saman julkaisun mukaan isolaatit olivat selvästi funktionaalisempia ja laadukkaampia kuin konsentraatit rasvan ja proteiinin määrään nähden sekä proteiinin liukoisuuden, vaahtoavuuden ja vaahton pysyvyyden, proteiinin denaturoimattomuuden ja kokkareisuuden sekä maun ja hajun suhteen. Konsentraattien suhteellisen korkea laktoosi- ja mineraalipitoisuus sekä heikko maku ja haju olivat tekijöitä, jotka rajoittivat konsentraattien käyttöä elintarviketeollisuudessa.

20

Heraproteiini-isolaattien hyviä ominaisuuksia ja käyttökelpoisuutta rajoittaa valmistusmenetelmästä johtuva tuotteen korkeahko hinta.

25

Muuttamalla proteiinien rakennetta kemiallisella reaktiolla voidaan vaikuttaa molekyylin varaukseen, avarusrakenteeseen ja siten eräisiin muihinkin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja osittain emulgointiominaisuuksiinkin.

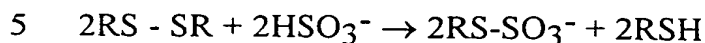
30

Käytännöllisin ja yksinkertaisin kemiallinen menetelmä proteiinin molekyylin rakenteen muuntelussa on sulfonointi, so. oksidatiivinen sulfitolyysi (sulfitolyysi + hapetus). Siinä proteiinien aminohappoketjujen väliset rikkisillat eli disulfidisidokset aukaistaan, kun sulfiitti-ioneja lisäämällä käynnistetään hapetuspelkistysreaktio, jossa toinen rikki hapettuu sulfonaatiksi ja toinen pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi.

35

Lisäämällä mukaan vielä hapettava tekijä vapaat sulfhydryyliryhmät hapettuvat jälleen disulfidisidoksiksi, jotka puolestaan jatkavat reaktiossa niin kauan, kunnes kaikki sulf-

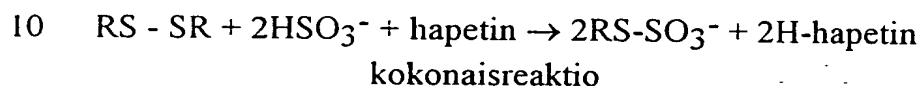
hydriyliryhmät ovat sulfonoituneet tai reaktion jokin muu tekijä on muodostunut rajoittavaksi. Sulfonoinnin eli oksidatiivisen sulfitolyysin periaate on kuvattu seuraavassa kaaviossa:



sulfitolyysi



hapetus



Siinä  $RS - SR$  kuvaa proteiinimolekyyliä, joka koostuu kahdesta aminohappoketjusta R, jolloin  $S - S$  on kahden aminohappoketjun välissä oleva disulfididisidos, joka yhdistää aminohappoketjut ja pitää niitä osaltaan lukittuna tiettyyn asentoon, joka laukeaa reaktion myötä. Muunnetut proteiinimolekyylit ovat saostettavissa liuoksesta laskemalla pH:ta sulfitolyysireaktion pH:sta pH 3-5:een.

Oksidatiivista sulfitolyysiä on julkaisussa Kella, N.K.D., et al., J. Agr. Food Chem., 37 (1989), 1203-1210, käytetty heran proteiini-isolaattien molekyyliden muunteluun tarkoituksena vaikuttaa proteiinien funktionaalisiin ominaisuuksiin kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja vaahton pysyvyyteen. Ominaisuuksiin vaikuttavana tekijänä oli disulfididisidosten vähentäminen suhteessa alkuperäisten disulfididisidosten kokonaismäärään. Tietyt ominaisuudet paranivat tai huononivat disulfididisidosten vähetessä. Mm. liukoisuus huononi alle 5 %:n jo 25 %:n disulfididisidoksista kadottua ja samalla liukoisuus-pH-käyrän liukoisuusminimi muuttui seuraavasti; disulfididisidosten poistuma %:eina sekä vastaava liukoisuusminimi pH-asteikolla: 25 % - pH 4,75; 50 % - pH 4,38; 75 % - pH 4,2; ja 100 % - pH 4,0.

Muuntelureaktiossa proteiini-isolaattien konsentraatio oli 1,0 % ja sulfiitin 0,1 M, urean 4 M sekä pH 7,0 ja lämpötila 25°C. Hapettavana tekijänä käytettiin liuoksen läpi puhallettua happea ja katalysaattorina  $\text{CuSO}_4$ :a liuotettuna 800 mM konsentraatioon. Eriasteisesti muunnellut proteiini-isolaatit eristettiin saostamalla ammoniumsulfaatilla, jota lisättiin liuokseen niin paljon, että siitä muodostui 50-%:isesti kyllästetty. Muutuneita liukoisuusominaisuuksia ei käytetty hyväksi proteiinien eristämisessä.

Julkaisussa Gonzalez, J.M., Damodaran, S., J. Food Sci., 55 (1990) no 6, 1559-1563, käytettiin oksidatiivista sulfitolyysiä tarkoituksena eristää sellaisen makean raaka-heran

- proteiineja, jonka proteiinipitoisuus on noin 0,6 %, lähes samoissa koe-olosuhteissa kuin edellä; pH 7,0, sulfiittikonsentraatio 0,1 M, lämpötila 25°C sekä hapettimena happi ja katalysaattorina  $\text{Cu}^{++}$ -ioni  $\text{CuCO}_3$ :na, mutta tässä tapauksessa kiinteinä helminä ja pakattuna lasikolonnein. Sulfitolyysin tuote hapetettiin sulfonaattijohdannaiseksi
- 5 kierrättämällä sitä mainituilla helmillä täytetyssä kolonnissa. Sen jälkeen helmijäänökset poistettiin nestemäisestä reaktioseoksesta sentrifugoimalla. Sulfonoidut ja kuparin kanssa kelatoituneet proteiinit eristettiin funktionaalisina saostamalla pH:ssa 4,5. Ennen saostamista liuoksesta jouduttiin kuitenkin poistamaan sulfonoituun heran proteiiniin kelatoitunut kupari EDTA-käsittelyllä. Tässäkin oli kysymyksessä työläs ja
- 10 monimutkainen laboratoriomitan toteutus kalliilla laitteistolla ja kemikaaleilla, kuten edellisessä artikkelissa. Korotetun lämpötilan reaktiota nopeuttavaa vaikutusta ei voida hyödyntää, sillä lämpötilan noustessa hapen liukoisuus ja siten sen pitoisuus (reagoiva määrä) alenee. Suolatkin alentavat liuoksen happipitoisuutta.
- 15 Heran proteiinien eristämistä toimivina tuotteina taloudellisesti on pyritty toteuttamaan jo kauan käyttämällä hyväksi monenlaisia menetelmiä, mutta esitetyt ratkaisut ovat olleet puutteellisia useastakin syystä.
- Edellä esitetyt sovellutukset, jotka perustuivat oksidatiiviselle sulfitolyysille, eivät joko
- 20 pyrkineet tarjoamaan ratkaisua eristämiseen, vaan ainoastaan tiettyjen ominaisuuksien muunteluun, tai esitetty ratkaisu on niin vaikeasti hyödynnettävissä tuotantomitassa, ettei se ole ollut toteuttamiskelpoinen.
- Keksinnön tarkoituksena on aikaansaada heran proteiinien eristämiseksi menetelmä ja
- 25 laitteisto, joka on mahdollisimman taloudellinen ja yksinkertainen. Lisäksi halutaan toimiva ja taloudellinen menetelmä heran eri proteiinien erottamiseksi toisistaan, jolloin voidaan poistaa heran proteiineista esim. pikkulapsille allergiaa aiheuttavat proteiinit. Keksinnössä pyritään myös sellaiseen heran proteiinien eristämismenetelmään, joka tuottaa mahdollisimman funktionaalista eli emulgointikykyistä, geelinmuodostus-
- 30 kykyistä ja vaahdonmuodostuskykyistä proteiinia. Tavoitteena on vielä mahdollisimman terveellisen ja miellyttävän sekä ihmisravinnoksi kelpaavan heran proteiinien valmistusmenetelmä.
- Keksinnössä pyritään myös menetelmään, jolla proteiinin koostumus saadaan halu-
- 35 tuksi.
- Nämä tavoitteet on nyt saavutettu uudella menetelmällä heran proteiinien eristämiseksi, joille pääasiassa on tunnusomaista se, mitä sanotaan patenttivaatimuksen 1 tunnusmerkkiosassa.

Keksinnössä on siis oivallettu, että pääasiassa vettä, laktoosia ja proteiineja sisältävän heran proteiinit voidaan eristää kaupallisesti käyttökelpoisella prosessilla, mikäli prosessi sisältää vaiheet, joissa

- a) suoritetaan heran esikäsitteily, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen vedestä,
- b) suoritetaan vaiheen a) esikäsitellyn heran sulfonointikäsitteily, jossa esikäsitelty hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa oleellisesti ilman katalysaattoria ja heran proteiinit sulfonoituvat, ja
- c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsitellyn heran loppukäsittely, joka ainakin käsittää heran sulfonoitujen proteiinien erottamisen käsitelystä herasta. Keksinnölle on nimenomaan tunnusomaista se, että esikäsitellyn heran sulfonointikäsitteily b) suoritetaan siten, että esikäsitelty hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa ilman katalysaattoria ja heran proteiinit sulfonoituvat.

15

Kun puhutaan vaiheen b) sulfonoinnista oleellisesti ilman katalysaattoria, tarkoitetaan nimenomaan ilman sellaista  $\text{CuCO}_3$ :n tapaista katalysaattoria, joka muuttaa ja/tai myrkyttää heraproteiinit. Muita elintarvikekelpoisia sulfonointia edistäviä aineita voidaan kylläkin käyttää. Keksinnön mukainen prosessi voidaan suorittaa joko jatkuvatoimise-

20

na tai panostyyppisenä. Prosessi on kuitenkin edullisesti panostyyppinen, jolloin vähintään kaksi vaiheista a), b) ja c) voidaan suorittaa peräkkäin käyttäen samaa astiaa ja/tai samoja käsittelylaitteita.

Keksinnön mukaisen menetelmän lähtöaineena käytetään juustontuotannosta saatavaa heraa. Kuten jo mainittiin, vaihe a) käsittää veden noin 75-95-%:isen poistamisen herasta. Tämä veden poistaminen voi tapahtua millä tahansa alalla tunnetulla operaatiolla, jolloin edullinen operaatio on ultrasuodatus, erityisesti käyttämällä 9 000 - 40 000 D:n ultrasuodatuskalvoa. Erityisen edullisella ultrasuodatuslaitteella suodatuskalvojen pidätysarvo on noin 10 000 D. Ultrasuodatuksessa hera konsentroituu siten, että sen nestevolyymi sisältää 4-16 kertaa enemmän kuiva-ainetta kuin konsentroimaton hera.

25

Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaihe a) käsittää sellaisen vesimäärän poistamisen, että esikäsitellyn heran proteiinipitoisuudeksi tulee noin 2-7 % (paino/tilavuus), edullisesti noin 4 % (paino/tilavuus). Vedenpoistossa ja edullisesti ultrasuodatuksessa muodostunut suodos voidaan ottaa talteen ja se on prosessissa syntyvä käyttökelpoinen sivutuote.

30

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan heran esikäsitteilyvaihe a) käsittää myös heran mikrosuodatuksen, joka edullisesti tapahtuu ennen veden noin 75-95-%:ista poistamista siitä. Mikrosuodatuksessa poistetaan herasta sinne jääneet maidon

35

5 kaseiinihiukkaset ja osa lipoproteiineista sekä vähennetään huomattavasti heran sisältämää bakteerimäärää tai poistetaan bakteerit kokonaan. Mikro-suodatus ei pidätä heran oleellisia proteiineja ja se suoritetaan käyttämällä 0,22-0,80  $\mu\text{m:n}$ , edullisesti noin 0,22  $\mu\text{m:n}$  kalvoja. Mikro-suodatuksen ansiosta ultrasuodatus helpottuu ja nopeutuu ja heran laatu paranee. Mikro-suodatettaessa heraa muodostuu pidätteenä sivutuotetta, joka on yksinkertaisimmillaan sopivaa rehukäyttöön lämpökäsittelyn jälkeen. Mikro-suodatuksen lipoproteiinit ovat myös käyttökelpoisia luonnollisina emulgointiaineina elintarvikkeissa.

10 Heran esikäsittelyvaiheen a) jälkeen suoritetaan vaiheessa b) proteiinien sulfonointi, joka käsittää esikäsitellyn heran saattamiseen kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatu-  
tuisen hapettavan yhdisteen kanssa. Kuten jo mainittiin, esikäsitelty hera on konsent-  
roitu ja edullisesti mikro-suodatettu. Sulfonoinnin toinen reagenssi eli sulfiitti voi olla  
mikä tahansa kemian alalla tunnettu sulfiitti tai sulfiitti-onia muodostava reagenssi.  
Erään suoritusmuodon mukaan sulfiittina käytetään tavallista sulfiittia, vetysulfiittia  
15 ja/tai metabisulfiittia. Tällöin ko. suolojen kationisena komponenttina voidaan käyttää  
mitä tahansa suolan kationia, kuten ammoniumia, tai jaksollisen järjestelmän jonkin  
ryhmistä 1-4 metallia, kuten alkalimetallia tai maa-alkalimetallia. On edullista käyttää  
sulfiittina alkalimetallin ja/tai maa-alkalimetallin sulfiittia, vetysulfiittia ja/tai metabi-  
sulfiittia, edullisesti natriumsulfiittia, natriumvetysulfiittia ja/tai natriummatabisulfiit-  
20 tia. Erityisen hyviä tuloksia saadaan, mikäli eo. keksinnön mukaisen menetelmän vai-  
heessa b) käytetään sulfiittina natriumvetysulfiittia.

Lopputuotteiden toiminnallisiin ja muihin ominaisuuksiin pystytään vaikuttamaan val-  
mistusprosessin sulfitolyysissä määrittämällä sulfiitin määrän suhde heraproteiinissa  
25 olevien disulfididisidosten määrään. Tyypillinen tapa laskea heraproteiinin sulfonointiin  
tarvittava sulfiittimäärä löytyy em. julkaisusta Gonzalez, J.M. ja Damodaran, S., J.  
Food Sci. 55 (1990), 1559-1563, jonka esitys liitetään tähän viitteeksi. Erään suoritus-  
muodon mukaan vaiheen b) sulfonoinnissa sulfiitin pitoisuus herakonsentraatissa on  
välillä noin 0,02-0,20 M, edullisesti välillä noin 0,05-0,10 M.

30 Menetelmän vaiheessa b) sulfonoinnin hapettimena käytetään keksinnön mukaisesti  
elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä (siis ei happikaasua), joka reagoi spontaanisti  
ja suoraan heraproteiinien sulfhydryyliryhmien (-SH) kanssa muodostaen disulfidiryh-  
miä, disulfididisidoksia. Keksinnölle on oleellista, että elintarvilaatuinen hapettava  
35 yhdiste on niin reaktiivinen, ettei sulfonointireaktiossa tarvita katalyyttiä. Katalyytin  
käyttöön liittyy nimittäin se vaikeus, että se kontaminoi heran proteiinit ja on hyvin  
vaikea poistaa tuotteesta.



- Elintarvikekelpoisia hapettimia tunnetaan alalla paljonkin, mm. elintarvikkeiden ja niiden puolivalmisteiden valkaisusta, kypsennyksestä ja ns. vettämisestä. Kirjallisuus mainitsee mm. erilaiset entsyymit, kuten aspergillus-flavus-oryzae-entsyymi, orgaaniset peroksidit, kuten asetoniperoksidi ja bentsoyyliperoksidi, epäorgaaniset peroksidit ja peroksisuolat, kuten ammoniumperoksisulfaatti, kaliumperoksisulfaatti ja kalsiumperoksidi, myrkyttömät atsoyhdisteet, kuten atsodikarbonamidi (ADA), nitrosyylidikloridi, L-kysteini, halogenaatit, kuten kaliumbromaatti, bromaatien ja jodaattien seokset, sekä kalsium- ja kaliumjodaatti. Myös yhdisteitä, kuten kalsiumstearoyyli-2-laktylaattia, klooria ja askorbiinihappoa on käytetty elintarvikekelpoisina hapettimina. On edullista, mikäli eo. keksinnön proteiinien sulfonointivaiheessa b) käytetään elintarvikelaatuisena hapettavana yhdisteenä elintarvikelaatuista peroksidiyhdistettä ja/tai halogenaattia, edullisesti vastaavasti kalsiumperoksidia  $\text{CaO}_2$  ja/tai kaliumbromaattia  $\text{KBrO}_3$ .
- Elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen pitoisuus proteiinien sulfonointivaiheessa b) voi suurestikin vaihdella, riippuen toivottavasta sulfonointiasteesta. Eristettävien heraproteiinien halutut ominaisuudet taas määräävät, mihin sulfonointiasteeseen on pyrittävä. Lisäksi sulfonointiaste vaikuttaa heraproteiinien eristysmenetelmään, kuten mikro-suodatukseen, ultrasuodatukseen ja saostusolosuhteisiin. Siten voidaan sanoa, että keksintö koskee mitä erilaisimpien elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen pitoisuuksien käyttöä proteiinien sulfonointivaiheessa b). Erään suoritustavan mukaan on kuitenkin edullista käyttää sellaista elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen pitoisuutta, joka on välillä noin 0,01-0,15 % (paino/tilavuus), laskettuna aktiivisena happena.
- Keksinnön mukaisen menetelmän optimoimiseksi on määriteltävä myös sopiva reaktiolämpötila, saostuksessa käytetty pH sekä pH:n muutoksissa käytetyt hapot ja emäkset sekä sopivat toimenpiteet haluttujen ominaisuuksien saamiseksi tuotteelle, joka voi olla heraproteiinin tai sen spesifisen fraktion konsentraatti, tahna tai jauhe.
- Erään edullisen suoritustavan mukaan vaiheen b) sulfonointilämpötila on noin 25-55°C, edullisimmin noin 30-50°C. Edullinen pH, jossa sulfitolyysi ja hapetus tapahtuu, on välillä noin 5,0-8,5. pH voidaan säätää myrkyttömällä hapolla ja emäksillä, esim. lisäämällä suolahappoa  $\text{HCl}$  ja natriumhydroksidia  $\text{NaOH}$  tarpeen mukaan vaiheen b) sulfonointiseokseen.
- Kuten edellä esitettiin, vaiheen b) sulfonointi koostuu itse asiassa kahdesta reaktiosta, sulfitolyysistä ja hapetuksesta. Nämä reaktiot voidaan joko suorittaa samanai-

kaisesti tai peräkkäin. Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaiheen b) sulfonointi eli sulfitolyysi ja hapetus suoritetaan kahdessa alivaiheessa siten, että b<sub>1</sub>) heran proteiinit sulfitolysoidaan saattamalla esikäsitelty hera kosketukseen sulfiitin kanssa ja b<sub>2</sub>) sulfitolysoidut proteiinit hapetetaan saattamalla ne kosketukseen elintarvikelaatuksen hapettavan yhdisteen kanssa. Tällöin on edullista käyttää muuten samoja parametrejä kuin edellä on esitetty sulfonointivaiheen b) käsittelyn yhteydessä, paitsi että alivaihe b<sub>1</sub>) suoritetaan pH:ssa noin 6,0-7,5 ja edullisimmin pH:ssa 6,5-7,0. Edullinen reaktioaika on noin 10-50 minuuttia. Alivaihe b<sub>2</sub>) suoritetaan edullisesti pH:ssa noin 5,0-7,0 eli hieman alempana kuin alivaihe b<sub>1</sub>) ja edullisimmin pH:ssa noin 5,5-6,5. Reaktioaika on edullisesti noin 15-60 minuuttia eli hieman pitempi kuin vaiheessa b<sub>1</sub>). Molempien vaiheiden b<sub>1</sub>) ja b<sub>2</sub>) edullinen lämpötila on noin 25-55°C, edullisimmin noin 30-50°C.

Kun esillä olevan keksinnön mukaisen prosessin vaiheen b) proteiinien sulfonointi on suoritettu loppuun, saadaan tuloksena seos, joka muodostuu oleellisesti laktosista ja sulfonoiduista proteiineista vesiliuoksena, sulfonoitu herakonsentraatti. Tälle liuokselle suoritetaan loppukäsittely vaiheessa c), jossa sulfonoidut proteiinit erotetaan siitä ja otetaan talteen. Erotus ja talteenotto voi tapahtua pääasiassa kolmen menetelmän mukaisesti: konsentroimalla sulfonoidut proteiinit, saostamalla ne tai suorittamalla niille fraktiointisaostus. On tietenkin selvää, että nämä kolme päämenetelmää voidaan modifioida ja yhdistää esim. siten, että saostus suoritetaan vain rajoitetulle fraktiomäärälle ja loput fraktiot konsentroidaan, jne. On myös selvää, että keksinnön mukaiseen menetelmään kuuluu olemassa olevien operaatiomahdollisuuksien ja laitteiden käytön vaihtelu siten, että tarvittaessa vaihdellaan em. vaiheen c) erotus- ja talteenotto-operaatioita.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan prosessin sulfonoitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c) käsittää sulfonoitujen proteiinien erottamisen käsittelystä herasta lisäkonsentroimalla, jolloin saadaan talteen oleellisesti kaikki sulfonoidut proteiinit yhdessä käsittävä tuote, kokonaisproteiinituote. Tämä vaihtoehto johtaa pikemminkin edulliset funktionaaliset ominaisuudet omaavaan proteiiniseokseen kuin toisistaan erotettuihin puhtaisiin proteiineihin. Prosessivaihtoehdon mukaan proteiineja ei tarvitse vaiheessa b) sulfonoida saostusta silmälläpitäen, vaan funktionaalisia ominaisuuksia, kuten vaahtoavuutta, vaahtoon pysyvyyttä, viskositeettia, liukoisuutta, emulgointikykyä ja geeliytyvyyttä silmälläpitäen. Kuten hakemuksen johdannosta ilmeni, sulfonoidut proteiinit saostuvat happamassa pH:ssa. Silloin, kun sulfonoitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c) käsittää niiden konsentroidon ilman saostusta, sulfoniryhmät jäävät rakenteeseen parantaen em. funktionaalisia ominaisuuksia.

On edullista, mikäli vaiheen c) sulfonoitujen proteiinien konsentroidi ja pesu tapahtuu ultrasuodattamalla. Tällöin voidaan käyttää ultrasuodatinta, jonka suodatuskalvojen pidätysarvo on välillä 9 000 - 40 000 D, edullisesti noin 10 000 D. On edullista konsentroida proteiineja mahdollisimman paljon, vähintään 10 paino-%:iin, mikä onnistuu helposti, kun laktoosi ja sulfonoinnissa muodostuneet suolat pestään pois tai niitä vähennetään oleellisesti. Tässä yhteydessä säädetään pH haluttuun arvoon.

Konsentroidi tapahtuu edullisesti pH:ssa 6-8, mikä on luonnollista, sillä alemmassa pH:ssa sulfonoidut proteiinit saattavat saostua, eivätkä ole enää konsentroitavissa liuoksena. Edullisin konsentroidi-pH on 6,5-7,5. Konsentraatin pesu lisäämällä konsentraattiin vettä tietty määrä ja suodattamalla se sen jälkeen pois tapahtuu ennen proteiinien lopullista konsentroidia.

Ultrasuodatus voidaan suorittaa esimerkiksi siten, että sulfonoitu herakonsentraatti siirretään konsentroidisäiliöön, suodossäiliöön, jossa se pestään ja konsentroidaan kierrättämällä konsentraattia ultrasuodatuslaitteessa. Tarpeellisen konsentroidin jälkeen mahdollisesti pH-vakioitu ja pesty konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivata proteiinijauheeksi. Ultrasuodatuksessa syntynyt suodos otetaan talteen ja se voidaan käyttää mm. maitohapon fermentointiin.

Ultrasuodatus tapahtuu esim. siten, että sulfonoitujen proteiinien vesiliuos siirretään konsentroidisäiliöön, jossa se konsentroidaan kierrättämällä liuos ultrasuodatuslaitteessa. Tarpeellisen konsentroidin jälkeen mahdollisesti pesty ja pH-vakioitu konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivata valmiiksi proteiinijauheeksi. Ultrasuodatuksessa syntynyt suodos voidaan ottaa talteen ja käsitellä tai jalostaa edelleen.

Erään suoritustavan mukaan vaihe c) käsittää vesiliuoksessa olevien sulfonoitujen proteiinien puhdistamisen mikrosuodatuksella, joka edullisesti tapahtuu ennen mainittua konsentroidia. Mikrosuodatus tapahtuu edullisesti laitteella, jossa käytetään 0,22 µm:n kalvoja, joilla sulfonoitujen proteiinien liuoksesta poistetaan sulfonointivaiheessa b) siihen muodostuneet liukenemattomat epäpuhtaudet.

Kuten edellä mainittiin, sulfonoitujen proteiinien konsentraattia voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivata jauheeksi. Keksinnön erään suoritustavan mukaan vaihe c) käsittää konsentraatin proteiinien hydrolysoinnin pienimolekyyllisiksi peptideiksi. Pienentämällä proteiinien molekyylikokoa voidaan jossain määrin vähentää proteiinien allergeenisia ominaisuuksia. Myös proteiinien toiminnallisia ominaisuuksia

5 voidaan tietyissä määrin muunnella molekyylikokoa pienentämällä. Mainittu hydrolysointi tapahtuu edullisesti entsyymaattisesti, jolloin syntyy kokoheraproteiinihydrolysaattia. Entsyymaattinen hydrolyysi tapahtuu edullisesti membraanireaktorissa, jossa entsyymit hajottavat proteiinia halutun kokoisiksi peptideiksi ennen mainittua kuivausta tai käyttöä sellaisenaan.

10 Keksinnön mukaisen prosessin vaiheen c) sulfonoitujen proteiinien loppukäsittely käsittää edullisesti konsentroimalla erotettujen sulfonoitujen proteiinien tai niiden hydrolysoinnista syntyvän kokoheraproteiinihydrolysaatin kuivaamisen kiinteäksi jauheeksi. Konsentroinnista saatava suodos voidaan haluttaessa johtaa rikkidioksidin poistoon, joka tapahtuu alentamalla pH, edullisesti arvoon  $\leq 5$ , ja lämmittämällä, edullisesti lämpötilaan noin 30-50°C. Tällöin suodoksessa oleva sulfiitti muuttuu rikkidioksidiksi/rikkihapokkeeksi, joka poistetaan puhaltamalla inertillä ja steriilillä kaasulla. Rikkihapoke neutraloidaan edullisesti prosessissa käyttökelpoiseksi sulfiitiksi, kuten natriumvetysulfiitiksi. Neutralointiin voidaan käyttää natriumhydroksidia NaOH.

20 Edellä on käsitelty sulfonoitujen proteiinien loppukäsittelyvaihetta c), joka käsittää mainittujen sulfonoitujen proteiinien erottamisen konsentroimalla ja mahdollisesti kuivaamalla. Toinen käyttökelpoinen menetelmä sulfonoitujen proteiinien erottamiseksi on suorittaa niiden saostaminen happamassa pH:ssa. Tällöin syntyvä sakka sisältää ko. pH:ssa liukenemattomat proteiinit, kuten  $\alpha$ -laktalbumiinin ja naudanseerumialbumiini BSA:n sekä mm. immunoglobuliinit, laktoferriinin ja -peroksidaasin, ja jäävä vesifaasi sisältää ko. pH:ssa liukenevat proteiinit, kuten  $\beta$ -laktoglobuliinin. Saostuksen jälkeen sakka erotetaan vesifaasista. On edullista suorittaa proteiinien sulfonointivaihe b) ja sulfonoitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c), joka tässä tapauksessa on saostaminen ja sakan erottaminen, peräkkäin käyttäen samaa astiaa.

30 Sulfonointivaiheen b) jälkeen sulfonoidut proteiinit saostetaan siis vaiheessa c) laskeamalla pH riittävästi happamen puolelle. Saostuksessa käytetyt muuttujat ja niiden arvot ovat: saostus-pH on noin 2,5-6,5, edullisesti noin 3,0-5,0. Edullinen saostuslämpötila on noin 25-55°C, mielellään noin 30-50°C. Lisäksi on edullista erottaa sulfonoidut proteiinit siirtymällä hitaasti, edullisesti 10-40 min aikana, proteiinien vaiheen b) pH-arvosta vaiheen c) sulfonoitujen proteiinien saostus-pH-arvoon, edullisesti viimeksi mainitun pH-arvon alarajaan. pH:n happamaksi säätämisen jälkeen on edullista suorittaa saosteen sekoitus noin 10-60 min ajan. Saostus-pH aikaansaadaan myrkyttömällä ja edullisesti epäorgaanisella hapolla. Erityisen edullinen epäorgaaninen happo on HCl. Mikäli pH-arvo halutaan nostaa, se tapahtuu

edullisesti myrkyttömällä epäorgaanisella emäksellä, kuten natriumhydroksidilla NaOH. Erään edullisen suoritusmuodon mukaan proteiinien sulfonointivaihe b) ja sitä seuraava sulfonoitujen proteiinien loppukäsittelyvaiheen c) saostus suoritetaan vuorotellen vähintään kahdessa rinnakkain kytketyssä astiassa. Tämä tapahtuu edullisesti siten, että vaihe b) ja vaihe c) tehdään kahdessa astiassa vuorotellen tai siten, että vaiheiden b) ja c) täyttö-, tyhjennys- ja erotusoperaatiot vuorottelevat vaiheiden pääoperaatioiden (sulfonointi, saostus) kanssa tai siten, että erotusoperaatio vuorottelee em. pääoperaatioiden muodostaman peräkkäiskokonaisuuden kanssa. Siten voidaan laitteistoa käyttää mahdollisimman tehokkaasti hyväksi vuoroperaatteella.

10

Keksinnön mukaisen prosessin vaiheen c) saostuksen jälkeen syntynyt sakka erotetaan vesifaasista. Tämä erotus voi tietenkin tapahtua millä tahansa biokemiallisen laitetekniikan tuntemalla tavalla. Tyypillisiä sakan erottamismenetelmiä ovat separointi ja/tai mikrosuodatus. Erään suoritusmuodon mukaan vaihe c) käsittää happamassa pH:ssa olevan saosteen (sakka + vesifaasi) konsentroinnin mikrosuodattamalla, edullisesti ennen sakan eristämistä saosteesta tai sen konsentraatista toisella menetelmällä, jolloin ainakin osa vesifaasista erottuu sakasta. On edullista, mikäli mainittu toinen menetelmä on separaattorierotus ja edullisimmin sentrifugiseparaattorierotus. Sakka, saostuma, on siis hyvä eristää saosteesta separaattorilla ja edullisesti ensin mikrosuodattamalla ja sitten separaattorilla, kun eristetty proteiini halutaan tahnana.

20

Kun vaiheen c) sakka on eristetty saosteesta, se voidaan jatkojalostaa monella tavalla. Erään suoritusmuodon mukaan sakka voidaan pestä lisäämällä siihen pesuvettä ja konsentroimalla se uudestaan esim. käyttämällä separaattoria. Eristetty ja mahdollisesti pesty sakka voidaan konsentroida proteiinitahnaksi, edullisesti käyttämällä sentrifugiseparaattoria, hihnasuodatinta ja/tai rumpusuodatinta. Valinnaisesti proteiinitahnaa voidaan sekoittaa ja/tai sen pH:ta säätää, edullisesti arvoon 6-8, emäksellä tai emässeoksella. Proteiinitahnan neutralointi tällä tavalla tapahtuu edullisesti myrkyttömällä emäksellä tai emässeoksella, joka edullisesti on epäorgaaninen emäs. Sopivia emäksiä ovat natriumhydroksidi NaOH, natriumhydroksidin NaOH, kalsiumhydroksidin  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ja kaliumhydroksidin KOH seos, jolloin kalsiumhydroksidin  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  määrä edullisimmin on sellainen, että se korvaa vähintään heran alkuperäisen kalsiumin Ca määrän.

35

Kun keksinnön mukaisen prosessin vaihe c) suoritetaan erottamalla proteiinit saostamalla, saostuksesta jää sakan lisäksi vesifaasi eli suodos. Kuten edellä mainittiin, tämä vesifaasi sisältää ko. pH:ssa liukoisia proteiineja, kuten  $\beta$ -laktoglobuliinia.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan nämä vesifaasin sisältämät liukoiset proteiinitkin otetaan talteen. Talteenotto voidaan suorittaa ultrasuodattamalla, mikä tapahtuu oleellisesti samalla tavalla kuin edellä on esitetty prosessivaiheen c) kokonaisproteiinikonsentroidinvaihtoehdon yhteydessä. Liukoiselle proteiinifraktiolle voidaan tämän mukaan suorittaa myös jatkokäsittelyjä, kuten konsentroidinti, pH:n säätö, pesu, hydrolyysi ja/tai kuivaus.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan heran proteiinien eristäminen tapahtuu seuraavina jaksoina: heran konsentroidinti ultrasuodattamalla, konsentraatin proteiinien rakenteen muuttaminen sulfonoinnin avulla, saostaminen laskemalla pH:ta, saostuneiden proteiinien konsentroidinti ja pesu mikrosuodattamalla, niiden erottaminen sentrifugoimalla tai suodattamalla tai suihkekuivauksella ja saostumattomien proteiinien konsentroidinti ja pesu ultrasuodattamalla sekä erottaminen suihkekuivauksella.

Edellä on käsitelty keksinnön mukaisen prosessin vaiheen c) ne sulfonoitujen proteiinien erotus- ja talteenottovaihtoehdot, joissa proteiinit on eristetty konsentroidimalla tai saostamalla. Keksinnössä on nyt havaittu, että esillä olevan keksinnön mukainen prosessi, jossa proteiinia sulfonoidaan suoraan sulfiitin ja elintarvikelaatuksen hapettavan yhdisteen kanssa, soveltuu mainiosti heran proteiinien eristämiseen fraktiosaostuksen avulla. Fraktiosaostus merkitsee sitä, että heran proteiinit, paitsi että ne ovat erotettavissa käsitelystä herasta, myös ovat erotettavissa toisistaan niin, että ne saadaan talteen omina fraktioinaan.

Heran sulfonoidut proteiinit ovat jaoteltavissa useampaan osaan kuin vain kahteen: saostuvaan ja liukoiseen osaan. Vaihtelemalla sulfonointiastetta ja saostus-pH:ta voidaan sulfonoidut proteiinit saostaa useana eri osana, jolloin saostumien ja liukoisen osan proteiinikoostumus on määriteltävissä suhteellisen tarkasti. Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan sulfonoitujen proteiinien loppukäsittelyvaihe c) käsittää sulfonoitujen proteiinien erottamisen käsitelystä herasta ja toisistaan fraktiosaostamalla useassa happamassa pH:ssa, jolloin ensimmäisessä saostuksessa ensimmäisessä happamassa pH:ssa syntyvä sakka, joka sisältää ko. pH:ssa liukenemattomat proteiinit, erotetaan ja otetaan talteen, ja ko. pH:ssa syntyvälle vesifaasille, suodokselle, joka puolestaan sisältää ko. pH:ssa liukoiset proteiinit, suoritetaan toinen saostus toisessa happamassa pH:ssa jne., kunnes saadaan kutakin hapanta saostus-pH:ta vastaavat sakat, joissa on vastaavat proteiinit, ja kaikkien saostuksien jälkeen jäävä vesifaasi, jossa on kaikissa saostus-pH:issa liukoisena säilyneet proteiinit.

Erään edullisen suoritustavan mukaan vaihe c) käsittää sulfonoitujen proteiinien erottamisen fraktiosaostamalla kahdessa tai kolmessa happamassa, edullisesti alenevassa pH:ssa, edullisesti pH:ssa noin 5,0, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä  $\alpha$ -laktalbumiinista, pH:ssa noin 4,5, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä naudanseerumialbumiinista (BSA), ja pH:ssa noin 4,0, jolloin saostuvat esim. loput naudanseerumialbumiinista ja em. muut happamassa saostuvat proteiinit, mainitussa järjestyksessä, jolloin jäljelle jää vesifaasi, jossa on ko. kolmessa saostus-pH:ssa liukoisena säilyneet proteiinit, esim.  $\beta$ -laktoglobuliini. Tällöin ensimmäisestä saostuksesta ensimmäisessä happamassa pH:ssa syntyvän sakan erotus tapahtuu joko sentrifugoimalla ja/tai mikrosuodattamalla tai muulla alalla tunnetulla sakan erottamismenetelmällä, jolloin ko. pH:ssa jäävälle vesifaasille tai vesifaasin konsentraatille suoritetaan toinen saostus jne., kunnes eri pH:ssa saostetut proteiinit saadaan oleellisesti kiinteinä erikseen talteen ja liukenevat proteiinit voidaan edullisesti eristää konsentroimalla ja kuivaamalla viimeisestä saostuksesta jäänyt vesifaasi. Keksinnön mukaisella menetelmällä on mm. se etu, että sulfonoitujen proteiinien loppukäsittely, kuten esim. mikrosuodatus ja/tai ultrasuodatus, voidaan suorittaa vaiheen a) heran vastaavan tyyppisillä tai vastaavilla esikäsittelylaitteilla.

Vaiheen c) fraktiosaostuksen muut parametrit voivat esim. olla samanlaiset kuin normaalissa saostuksessa eli usean, edullisesti alenevan pH:n lisäksi sulfonoidut proteiinit voidaan erottaa saostamalla lämpötilassa 25-55°C, edullisesti lämpötilassa 30-50°C, siirtymällä hitaasti, edullisesti 10-40 min aikana, proteiinien edellisen saostuksen pH-arvosta seuraavan saostuksen pH-arvoon ja suorittamalla saosteen sekoitus uuden pH:n happamaksi säätämisen jälkeen noin 10-60 min ajan.

Samoin happamassa pH:ssa olevan saosteen (sakka + vesifaasi) konsentrointi voidaan suorittaa mikrosuodattamalla ja edullisesti ennen sakan eristämistä saosteesta tai sen konsentraatista toisella menetelmällä, kuten sentrifugiseparoinnilla, hihna-suodattamalla tai rumpusuodattamalla. Fraktiosaostuksessa on erityisen edullista käyttää vähintään kahta rinnakkain kytkettyä saostusastiaa, jotta peräkkäin suoritettavia saostuksia voitaisiin nopeuttaa.

Fraktiosaostuksen yhteydessä voidaan myös erottaa happamassa pH:ssa vapautuva rikkidioksidi/rikkihapoke ja ottaa se talteen, edullisesti johtamalla saostusseokseen steriloitua inerttiä kaasua, joka vie mukanaan rikkidioksidin/rikkihapokkeen säiliöön, jossa se mielellään neutraloidaan, mieluummin NaOH:lla, prosessissa uudelleen käyttökelpoiseksi natriumvetysulfiitiksi  $\text{NaHSO}_3$ , joka puolestaan syötetään sulfiitina takaisin sulfonointivaiheeseen b).

- Kuten mainittiin, sakka voidaan eristää saosteesta tai sen pestystä konsentraatista separaattorilla, kuten sentrifugiseparaattorilla. Pesty konsentraatti voidaan konsentroida proteiinitahnaksi, edullisesti käyttäen sentrifugiseparaattoria, hihnasuodatinta ja/tai rumpusuodatinta. Siinä tapauksessa, että saostumaa, sakkaa, ei ole erotettu mikrosuodattamalla eikä pesty ja konsentroitunut ultrasuodattamalla eikä pH:tä säädetty, proteiinitahnaa joudutaan sekoittamaan ja sen pH säätämään esim. arvoon 6-8 emäksellä tai emäseoksella, joka edullisesti on NaOH, NaOH:n,  $\text{Ca(OH)}_2$ :n ja KOH:n seos, jolloin  $\text{Ca(OH)}_2$ :n määrä edullisimmin on sellainen, että se korvaa vähintään heran alkuperäisen Ca:n määrän.
- 10 Kuten mainittiin, fraktiosaostuksen jälkeen suodos sisältää edelleen happamissa pH-arvoissa liukoisena säilyneet proteiinit, kuten  $\beta$ -laktoglobuliinin, joka edullisesti otetaan talteen esim. ultrasuodatuksella, jolloin se voidaan jatkokäsitellä, kuten konsentroida, pH-säätää, pestä, hydrolysoida ja/tai kuivata jauheeksi. Proteiinien fraktiointi voidaan suorittaa vaihtelemalla vaiheen b) sulfonointiastetta ja/tai vaiheen c) saostus-pH:ta.

Seuraavassa on esitetty lähempi yleinen kuvaus keksinnön erään suoritusmuodon mukaisesta menetelmästä suoritusesimerkkeineen ja laitteistokuvaus keksinnön neljän suoritusmuodon mukaisesta laitteistosta laiteselvityksineen ja viittauksineen kuviin, joissa kuvat 1-4 esittävät keksinnön eräiden suoritusmuotojen mukaiset laitteistot heraproteiinien eristämiseksi.

Herakonsentraatin proteiinien rakenteen muuttaminen tapahtuu sulfonoinnin avulla, jolloin disulfididisosten sulphydryyliryhmät sekä vapaat sulphydryyliryhmät sulfonoidaan määrällisesti halutulle tasolle. Heraproteiinien sulfitolyysi ja hapetus toteutetaan tässä suoritusmuodossa seuraavalla tavalla:

Herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus on esimerkiksi 4 %, otetaan tarvittava määrä reaktoriin, jossa on tehokas sekoitus sekä lämpötilan ja pH:n mittausta ja säätö.

Konsentraatin lämpötilaksi säädetään 30-50°C, esim. 35-45°C. Lämpötilan valinta johtuu mm. halutusta reaktionopeudesta, käytetyistä kemikaaleista sekä eristettävälle proteiineille halutuista funktionaalisista ja muista ominaisuuksista. Vakiolämpöiseen herakonsentraattiin lisätään sulfiittia joko  $\text{NaHSO}_3$ :na,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ :nä tai  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ :na 0,02-0,2 M, esim. 0,05-0,1 M, ja sekoitetaan tehokkaasti. Lisättävän sulfiitin määrä riippuu mm. proteiinkonsentraatiosta ja halutusta sulfitolyysiasteesta.



pH säädetään välille 6,0-7,0, esim. 6,5. pH:n säädössä käytetään elintarvikelaatuisia happoja ja emäksiä, kuten HCl:a ja NaOH:ta. Reaktioaika, jona sulfiitti vaikuttaa proteiineihin, on 10-50 minuuttia, edullisesti 20-40 minuuttia. Aika määräytyy edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutuksesta halutun reaktiotasapainon saavuttamiseksi.

Tämän jälkeen lisätään reaktoriin hapetin. Hapettimena tulevat kyseeseen ne elintarvikelaatuiset hapettavat kemikaalit, joiden aktiivisuus on hallittavissa kyseisissä olosuhteissa niin, että proteiinit saadaan tehokkaasti eristetyiksi ja niille saadaan halutut ominaisuudet sekä koostumus. Käyttökelpoisia kemikaaleja ovat mm. bromaatit, esim.  $\text{KBrO}_3$  (aktiivisen hapen määrä 28,6 %), ja peroksidit, esim.  $\text{CaO}_2$  (aktiivisen hapen määrä 22,2 %). Hapettimen määrä määräytyy hapetettavien sulphydryyliryhmien sekä hapettimen aktiivisen hapen määrän mukaan, esim.  $\text{CaO}_2$ :n määrä on 0,1-1,0 %, edullisesti 0,2-0,6 %, seoksen tilavuudesta (paino/tilavuus- %) herakonsentraatissa, jossa proteiinipitoisuus on 2-7 %.

Herakonsentraatin pH:ksi säädetään 5,0-7,0, esim. 5,5-6,5. pH:n valinta riippuu siitä, kuinka nopeaksi hapetusreaktio halutaan ja miten sen halutaan vaikuttavan lopputuotteen ominaisuuksiin. Reaktiolämpötila voidaan pitää samana kuin sulfitolyysissä tai muuttaa edellä annettujen arvojen puitteissa reaktionopeuden säätelämiseksi.

Reaktioaika voi olla 15-60 minuuttia, edullisesti 30-45 minuuttia. Tänä aikana konsentraattia sekoitetaan tehokkaasti. Ajan pituudella voidaan vaikuttaa reaktion täydellisyyteen ja aktiivisuuden kanssa proteiinien saantoon, koostumukseen ja ominaisuuksiin.

Oksidatiivisen sulfitolyysin kaikilla tärkeillä muuttujilla eli herakonsentraatin proteiinipitoisuudella, sulfiitin määrällä, reaktioseoksen eri vaiheissa käytetyillä pH:illa ja lämpötiloilla, hapettavan yhdisteen ominaisuuksilla ja määrällä sekä eri vaiheissa käytetyillä reaktioajoilla voidaan vaikuttaa eristysprosessin eri osareaktioiden toteutumiseen ja kokonaisuutena koko prosessin lopputulokseen eli eristettävien proteiinien määrään, koostumukseen ja haluttuihin ominaisuuksiin.

Proteiinit, halutun muuntelun jälkeen, saostetaan laskemalla pH hitaasti 3,5-5,5:een, edullisesti 4,0-5,0:aan. Saostuksessa käytettävä pH riippuu mm. oksidatiivisen sulfitolyysin asteesta eli siitä, mikä osa olemassa olevista disulfididisidoksista ja vapaista sulphydryyliryhmistä on sulfonoitu. Saostamiseen käytetty aika on 10-60 minuuttia,

esim. 20-40 minuuttia. Saostettujen proteiinien konsentrointi ja pesu tapahtuu mikrosuodattamalla sekä erotus suodattamalla nauha- tai rumpusuodattimella tai sentrifugoimalla, jolloin tuotteena saadaan proteiinitahnaa.

- 5 Pesu on konsentroidin yhteydessä tärkeää, koska siinä voidaan poistaa konsentraatissa oleva laktoosi sekä samalla muuntelussa ja saostuksessa lisätyt ylimääräiset kemikaalit ja syntyneet suolat, jotka muutoin jäisivät proteiinivalmistukseen.

- 10 Lopullinen tuote valmistetaan tahnasta nostamalla sen pH 6-8:aan lisäämällä NaOH:ta ja  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :ta tai NaOH:ta, KOH:ta ja  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :ta sopivassa suhteessa. Kalsiumin lisääminen eristettyihin heraproteiineihin palauttaa niiden alkuperäisen kalsiumtasapainon sekä parantaa niiden geeliytymisominaisuuksia.

- 15 Saostekonsentraatti on käytettävissä sellaisenaan tai kuivattuna mm. suihkekuivaimella, jolloin tuote on proteiinijauhe. Kuivattavaksi tarkoitetun saostekonsentraatin pesu, pH:n nosto 6-8:aan käyttämällä edellä mainittuja emäksiä ja lopullinen konsentrointi tapahtuu ultrasuodattamalla ennen kuivausta. Saostetta konsentroitaessa mikrosuodattamalla syntynyt suodos konsentroidaan, sen pH säädetään kuten edellä ja pestään ultrasuodattamalla. Saatu konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai
- 20 kuivata proteiinijauheeksi. Proteiinien saostaminen saatetaan tehdä peräkkäin, alenevissa ja tarkasti määräytyissä pH:issa, jolloin saadaan eristetyksi tietyt proteiinit esim.  $\alpha$ -laktalbumiini ja naudan seerumialbumiini (BSA) (fraktiosaostus). Muodostuneet saostumat, sakat, sekä suodokset ovat käsiteltävissä kuten edellä on kuvattu kokonaissaostuksen yhteydessä.

25 Seuraavat esimerkit kuvaavat edellä esitettyä keksintöä.

### Esimerkki 1

- 30 Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynyttä esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 0,60 % (proteiinityyppi x 6,38) ja kokonaistypen (muutkin tyypiyhdisteet) mukaan laskettu proteiinipitoisuus 0,80 %, mikrosuodatettiin 0,45  $\mu$ :n suodatinkalvolla Millipore Pellicon -laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodosta konsentroitiin ultrasuodattamalla samalla laitteistolla 10 000 D:n ultrasuodatuskalvojen läpi niin, että osa suodoksesta konsentroitiin 4 x:ksi ja osa 8 x:ksi eli konsentraattien lopputilavuudet olivat vastaavista alkutilavuuksista 25 % ja 12,5 %. Vastaavat proteiinipitoisuudet olivat 2,06 paino/tilavuus-% ja 4,01 paino/tilavuus-%. Eristämistä varten otettiin 4 x:stä herakonsentraattia 1,0 l 2 l:n lasiastiaan. Sitä pidettiin lämpötilaltaan
- 35 säädettävässä vesihauteessa ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla sekoittimella.

Konsentraatin lämpötila säädettiin 35°C:een. Sulfitolyysin käynnistämiseksi konsentraattiin lisättiin 5,2 g  $\text{NaHSO}_3$ :a ja pH säädettiin 6,5:een lisäämällä  $\text{NaOH}$ :ta. Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 minuuttia. Sen jälkeen seokseen lisättiin  $\text{KBrO}_3$ :a 1,0 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusreaktio kesti 15 minuuttia.

5 Tämän jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,40:een lisäämällä seokseen  $\text{HCl}$ . Saostumaa sekoitettiin vielä 30 minuuttia.

Saostuma erotettiin sentrifugoimalla Sorvall RC-5B -sentrifugissa 10 000 kierr./min 30 minuuttia. Saostetut proteiinit erottuivat hyvin. Proteiinit pestiin suspendoimalla ne tislattuun veteen ja sentrifugoimalla uudelleen. Proteiinimassa oli helposti irtoavaa ja lohkesi helposti palasiksi. Se varastoitiin kannelliseen lasiastiaan ja pakastettiin. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 3,0 g/100 ml herakonsentraattia. Proteiinisaanto määritettiin sentrifugoimalla 20 ml:n saostemäärä + 10 ml tislattua vettä 50 ml:n sentrifugiputkissa 30 minuuttia 10000 kierr./min. Sentrifugoinnin jälkeen kirkaste kaadettiin pois ja putkia pidettiin ylösalaisin vettä imevällä alustalla noin 15 minuuttia irtoveden valuttamiseksi, minkä jälkeen ne punnittiin 5-10 minuutin sisällä. Rinnakkaismääritysten tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan. Näin saadut tulokset korreloivat hyvin proteiinimääritysten kanssa, mutta olivat sitoutuneen vesimäärän verran suurempia. Määritykset olivat huomattavasti nopeampia ja helpompia tehdä ja siksi niitä käytettiin saantojen määrittämisessä.

10

15

20

### Esimerkki 2

1,0 l 8 x konsentroitua edellisessä esimerkissä mainittua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 4,01 %, lämmitettiin 45°C:iseksi ja sekoitettiin tehokkaasti. Siihen lisättiin  $\text{NaHSO}_3$ :a 10,40 g. pH säädettiin 6,5:een. Sulfitolyysin reaktioaika oli 30 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin  $\text{KBrO}_3$ :a 2,0 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetuksen reaktioaika oli 15 minuuttia. Hapetusajan päätyttyä proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een  $\text{HCl}$ :lla. Seosta sekoitettiin vielä 30 minuuttia saostuksen loppuunsaattamiseksi.

25

30

Proteiinit erotettiin ja pestiin sentrifugoimalla kuten esimerkissä 1. Proteiinit olivat helposti irtoavia ja lohkottavissa helposti palasiksi. Eristetty proteiinimassa pakastettiin kannellisessa lasiastiassa myöhempää käyttöä varten. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,0 g/100 ml herakonsentraattia.

35

### Esimerkki 3

Esimerkki 1:ssä selostetulla tavalla 4 x konsentroitua edam-juuston valmistuksessa syntynyttä ja separoitua esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 1,92 %, otettiin 1,0 l ja

lämmitettiin 35°C:een sekoittaen tehokkaasti. Konsentraattiin lisättiin NaHSO<sub>3</sub>:a 5,2 g. pH säädettiin ja pidettiin 6,5:ssä. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Sulfitolyysi-reaktion jälkeen seokseen lisättiin CaO<sub>2</sub>:ta (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa; aktiivisen hapen määrä noin 13,3 %) 2,2 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetus-  
 5     aika oli 15 minuuttia, jona aikana seosta sekoitettiin tehokkaasti. Hapetuksen jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia. Proteiinit erotettiin ja pestiin sekä varastoititiin kuten esimerkissä 1. Eristetty proteiinimassa oli pehmeää, haurasta eikä helposti levitettävissä. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 1,75 g/100 ml herakonsentraattia.

10

#### Esimerkki 4

Esimerkki 3:ssa valmistetuista herakonsentraateista otettiin 1,0 l 8 x väkevöityä konsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli myös 4,01 %. Konsentraatti lämmitettiin 45°C:een ja sekoitettiin tehokkaasti. Siihen lisättiin 10,40 g NaHSO<sub>3</sub>:a. pH säädet-  
 15     tiin ja pidettiin 6,5:ssä. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisät-  
 tiin CaO<sub>2</sub>:ta (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa) 4,3 g. pH pidettiin edel-  
 leen 6,5:ssä. Hapetus-  
 20     aika oli 15 minuuttia. Hapetuksen jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia. Proteiinit erotettiin ja pestiin sekä varastoititiin kuten esimerkissä 1. Proteiinimassa oli pehme-  
 ähköä ja haurasta eikä levityskelpoista. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,85 g/100 ml herakonsentraattia. Proteiinimassasta otettiin kaksi noin 10 g:n  
 näytettä, joista toisen pH nostettiin noin 6,5:een lisäämällä 1,0 N NaOH:ta 0,4 ml:a ja sekoittamalla hyvin ja toiseen lisättiin 1,0 N NaOH:ta 0,25 ml ja 0,15 ml kylläs-  
 25     tettua Ca(OH)<sub>2</sub>:ta. pH:n noston jälkeen ensimmäinen näyte oli pehmeää, levitettä-  
 vää, ei kokkareista eikä tarttuvaa. Toinen näyte oli edellistä vähän jäykempi mutta levitettävää, ei kokkareista eikä tarttuvaa.

#### Esimerkki 5

Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynyttä esiheraa, jonka proteiini-  
 30     pitoisuus oli 0,59 % mikro- ja ultrasuodatettiin samoilla laitteilla ja saman ohjel-  
 man mukaan kuin esimerkissä 1 8 x:ksi ja 16 x:ksi, jolloin niiden proteiinipitoisuu-  
 det olivat vastaavasti 3,92 % ja 7,00 %. 1,0 l 8 x konsentroitua herakonsentraattia proteiinipitoisuudeltaan 3,92 % lämmitettiin 45°C:iseksi ja sitä sekoitettiin jatku-  
 vasti.

35

Siihen lisättiin Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:tä 9,50 g. pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Sulfitolyysin reaktioaika oli 15 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin CaO<sub>2</sub>:ta 4,30 g. pH säädettiin 5,5:een ja hapetuksen reaktioaika oli 30 minuuttia. Hapetuksen päätyttyä

seoksen pH laskettiin 4,0:aan HCl:lla proteiinien saostamiseksi. Saostumaa sekoitettiin vielä 15 minuuttia. Saoste mikrosuodatettiin 0,45  $\mu$ :n kalvolla samalla Milliporen laboratoriolaitteella, jolla herakin käsiteltiin, ja konsentroitiin noin 2 x:ksi. Suodatus sujui nopeasti ja suodos oli kirkas, mikä osoitti, ettei saostuneita proteiineja tullut suodatuskalvon läpi. Konsentraatti pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä. Konsentraatin pH nostettiin 6,5:een. Konsentraatin kuiva-ainepitoisuus ja tuhka oli noin 30 % alkuperäisestä pitoisuudesta, mikä oli tarkoituskin. Konsentraatti kylmäkuivattiin ja säilytettiin kylmiössä myöhempää käyttöä varten. Suodoksesta tehtiin HPLC:llä määrittäminen heran proteiinien määräsuhteiden säilymisestä saostamisen ja eristämisen jälkeen. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 9,3 g/100 ml herakonsentraattia.

#### Esimerkki 6

1,0 l edellisessä esimerkissä mainittua 8 x konsentroitua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 3,93 %, lämmitettiin 45°C:iseksi ja sekoitettiin jatkuvasti. Siihen lisättiin Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:tä 9,5 g ja pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Sulfitolyysi kesti 15 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin seokseen hapettimena CaO<sub>2</sub>:ta 2,2 g ja pH säädettiin 5,5:een. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,0:aan HCl:lla. Seosta sekoitettiin vielä 15 minuuttia. Saoste konsentroitiin mikrosuodatuksella 2 x:ksi ja pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä kuten edellisessä esimerkissä. Saostekonsentraatin pH nostettiin 6,6:een. Sen kuiva-ainepitoisuus aleni alkuperäisestä noin 31 %:iin. Saostekonsentraatti kylmäkuivattiin ja säilytettiin kylmiössä. Mikrosuodatuksen suodosta konsentroitiin noin 2 x ultrasuodattamalla 10 000 D:n kalvolla Milliporen laboratoriolaitteella, kuten esimerkeissä käytettyjä herakonsentraatteja valmistettaessa. Suodoskonsentraatti pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä, minkä jälkeen sen pH nostettiin 6,4:ään. Konsentraatin kuiva-ainepitoisuus pieneni alkuperäisestä noin 31 %:iin. Konsentraatti kylmäkuivattiin säilytystä varten. Saosteen mikrosuodoksesta tehtiin HPLC:llä määrittäminen heran proteiinien määräsuhteiden säilymisestä käsittelyn ja saostuksen jälkeen. Verrattaessa tuloksia edellisen esimerkin tuloksiin huomattiin proteiinien määräsuhteiden muuttuvan erilaisen käsittelyn tuloksena. Erilaisella käsittelyllä voidaan vaikuttaa proteiinisaantoihin ja myös vaikuttaa saosteen ja suodoksen proteiinien määräsuhteisiin. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,1 g/100 ml herakonsentraattia.

#### Esimerkki 7

1,0 l esimerkissä 5 mainittua 16 x konsentroitua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 7,0 %, lämmitettiin 45°C:een samalla sekoittaen. Siihen lisättiin

Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>:a 12,6 g. pH säädettiin 6,5:een. Sulfitolyysin reaktioaika oli 15 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin CaO<sub>2</sub>:ta 4,3 g. pH säädettiin 6,0:aan. Hapetus aika oli 30 minuuttia. Proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,0:aan. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia saostuksen loppuunsaattamiseksi. Proteiinit erotettiin ja pestiin sentrifugoimalla kuten esimerkissä 1. Eristetty proteiinimassa pakastettiin kannellissa lasiastiassa myöhempää käyttöä varten. Sentrifugoimalla määritetty proteiini-saanto oli 12,0 g/100 ml herakonsentraattia.

#### Esimerkki 8 Heraproteiinien erotus, fraktiointi

10 Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynyttä esiheraa, jonka kokonaistypen (muutkin typpi yhdisteet kuin proteiinit) mukaan laskettu proteiinipitoisuus oli 0,82, mikrosuodatettiin 0,22 µ:n suodatinkalvoilla Millipore Pellicon -laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodosta konsentroidtiin ultrasuodattamalla samalla laitteistolla 10 000 D:n ultrasuodatuskalvojen läpi 8 x:ksi eli konsentraatin lopputilavuus oli vastaavasta alkutilavuudesta 12,5 %. Konsentraatin proteiinipitoisuus oli 4,04 paino/tilavuus-%.

20 Eristämistä ja fraktiointia varten otettiin herakonsentraattia 1,0 l 2 l:n lasiastiaan. Se pidettiin vakio lämpöisessä vesihauteessa ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla sekoittimella. Konsentraatin lämpötila pidettiin 45°C:ssa. Sulfitolyysin käynnistämiseksi konsentraattiin lisättiin SO<sub>3</sub><sup>=</sup>:ta 0,05 M ja pH säädettiin 6,5:een lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin tehokkaasti ja reaktio sai jatkua 30 min. Sen jälkeen seokseen lisättiin CaO<sub>2</sub>:a (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa) 0,22 % (paino/tilavuus-%). pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusreaktion kesto aika oli 15 min. Hapetuksen jälkeen seoksesta otettiin 10 ml:n näyte proteiinien koostumusmäärityksen lähtökoostumuksen määrittämiseksi.

30 Ensimmäinen saostus tehtiin pH:ssa 5,0. pH:n lasku suoritettiin lisäämällä tarpeellinen määrä HCl:ää. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 min. Saosteesta otettiin 150 ml:n näyte-erä, josta tehtiin myöhemmin käsiteltävät määritykset.

35 Toinen saostus tapahtui pH:ssa 4,5. Edellisen näytteen oton jälkeen jäljelle jääneen saosteen pH:ta laskettiin pH 4,5:een lisäämällä HCl:ää tarvittava määrä. pH:n laskun jälkeen saostumaa sekoitettiin vielä 15 min. Tämän jälkeen saosteesta otettiin 150 ml:n näyte-erä määritysten tekoa varten.

Kolmas saostus tapahtui pH:ssa 4,0. Edellisen näytteen oton jälkeen jäljelle jääneen saosteen pH laskettiin pH 4,0:aan lisäämällä tarvittava määrä HCl:ää. Saosteen se-

koitusta jatkettiin vielä 15 min. Tämän jälkeen saosteesta otettiin 150 ml:n näyte-erä määritysten tekoa varten.

- 5 Jäljelle jäänyt saoste noin 800 ml mikrosuodatettiin edellä mainitulla laitteella saostuman erottamiseksi. Suodosta konsentroitiin ultrasuodattamalla edellä mainitulla laitteella ja pestiin kaksi kertaa lisäämällä tislattua vettä konsentraattiin konsentraatin suuruinen määrä. Samalla pestävän konsentraatin pH säädehtiin 6,0:aan HCl:llä. Lisätyn vesimäärän suuruinen määrä suodosta suodatettiin pois. Näin vähennettiin alkuperäisen suodoksen sisältämää laktoosin ja käsittelyssä muodostuneiden suolojen, NaCl ja CaCl<sub>2</sub>, määrää. Lopuksi pesty ja pH-vakioitu konsentraatti kylmäkuivattiin jauheeksi.

- 15 Ensimmäisen, toisen ja kolmannen saostuksen saostenäytteestä (150 ml) määritettiin saostuman määrä esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Ensimmäisen saostuksen proteiinisäntö oli 7,0 g/100 ml, toisen 7,7 g/100 ml ja kolmannen 8,45 g/100 ml. Viimeisen saostuksen pH 4,0:ssa saosteen mikrosuodatuksen suodoksen proteiinin määrä konsentroidin, pesun ja kylmäkuivauksen jälkeen oli 57,0 % kuiva-aineesta, mikä puolestaan oli 6,6 g kuiva-ainetta/100 ml konsentraattia.

- 20 Kolmesta saostenäytteestä (150 ml) otettiin 80 ml saostetta 200 ml:n sentrifugiputkeen ja sentrifugoitiin Sorvall RC-5B-sentrifugilla 10 000 kierr./min 30 min saostuman erottamiseksi kirkasteesta. Kaikista kolmesta kirkasteesta otettiin näyte heran pääproteiinien, α-laktalbumiinin, BSA:n ja β-laktoglobuliinin määrittystä varten. Määrittelyn tehtiin SDS-PAG-elektroforeesina Pharmacia Phast System -laitteella.
- 25 käyttäen 10-15 % gradienttigelilevyjä valmistajan suosittelen ajo-ohjein. Jokaisella geelilevyllä ajettiin mukana määritettävien proteiinien mallinäytteet. Ajetun elektroforeesilevyn tulosten mukaan herakonsentraatti ja vastaava sulfonoitu herakonsentraatti sisälsivät vastaavat proteiinivyohtykeet etenemissuunnasta lähtöpiisteeseen päin lueteltuina α-laktalbumiini, mp 14 200; välittömästi sen jälkeen β-laktoglobuliini, mp 18 400 ja selvästi kauimpana BSA, mp 66 200. Lähellä BSA:ta, sen etenemissuunnan puolella oli yksi heikko vyöhyke ja vastakkaisella puolella kaksi lähellä toisiaan. Lähimpänä lähtöpiistettä oli selvä vyöhyke, joka lienee ollut immunoglobuliineja, mp 160 000. Kirkasteiden proteiinimäärittelyksissä saatiin seuraavat tulokset: Ensimmäisessä saostuksessa pH:ssa 5,0 poistui saostumana α-laktalbumiini. Muut proteiinit näyttivät olleen määrältään lähes ennallaan. Toisessa saostuksessa pH 4,5:ssä BSA ja sen läheisyydessä olleet vyöhykkeet poistuivat lähes kokonaan. β-globuliini näytti määrältään muuttumattomalta. Kolmannessa saostuksessa

pH:ssa 4,0 kaikki muut vyöhykkeet poistuivat paitsi  $\beta$ -laktoglobuliini. Se näytti olevan edelleen määrältään alkuperäisellä tasolla.

- 5  $\beta$ -laktoglobuliini näytti pysyneen kokonaan liuenneena suodoksessa saostuksessa pH:ssa 4,0 saostuman poiston jälkeen. Se eristettiin konsentroinnin ja pesun jälkeen liuksesta kylmäkuivaamalla, kuten edellä on jo todettu.

#### Esimerkki 9

- 10 Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynyttä esiheraa käsiteltiin samoin kuin esimerkissä 8, paitsi että konsentraatin proteiinipitoisuus oli 6,38 paino-/tilavuus-% ja vastaavasti lopputilavuus pienempi kuin 12,5 % alkutilavuuteen nähden. Eristäminen ja fraktiointi tapahtuivat muuten samoin kuin esimerkissä 8, paitsi että  $\text{SO}_3^-$ :n määrä oli 0,1 M ja  $\text{CaO}_2$ :n määrä 0,43 % (paino/tilavuus-%), josta oli seurauksena suurempi sulfonoitumisaste.

- 15 Saostusten saostumien määrät ja liukoisen osan proteiinipitoisuus olivat määritysten mukaan seuraavat: ensimmäinen saostus 12,0 g/100 ml, toinen saostus 13,0 g/100 ml ja kolmas saostus 14,6 g/100 ml. Liukoisesta osasta eristetyin proteiinin määrä oli 64,5 % kuiva-aineesta, mikä puolestaan oli 11,4 g kuiva-ainetta/100 ml konsentraattia.

- 20 Kolmen saostenäytteen kirkasteista tehdyt heran pääkomponenttien määritykset SDS-PAG-elektroforeesilla toteutettiin kuten esimerkissä 8. Tulosten mukaan herakonsentraatin ja sulfonoidun herakonsentraatin sisältämien proteiinien vastaavat  
25 vyöhykkeet olivat samanlaisia kuin esimerkissä 8.

- 30 Ensimmäisessä saostuksessa pH:ssa 5,0 poistui saostumana  $\alpha$ -laktalbumiini. Muut proteiinit näyttivät olleen määrältään ennallaan. Toisessa saostuksessa pH:ssa 4,5 BSA ja sen läheisyydessä olevat proteiinit ovat huomattavasti vähentyneet, mutta niitä on vielä selvästi jäljellä.  $\beta$ -laktoglobuliini oli vielä kokonaan jäljellä. Kolmannessa saostuksessa pH:ssa 4,0 kaikki muut vyöhykkeet, proteiinit, poistuivat paitsi  $\beta$ -laktoglobuliini. Sen määrä näytti olleen alkuperäisellä tasolla.

- 35  $\beta$ -laktoglobuliini oli määrältään alkuperäisenä ja liuenneena suodoksessa saostuman poiston jälkeen saostuksessa pH:ssa 4,0. Se eristettiin konsentroinnin ja kahden pesun jälkeen konsentraatista, liuksesta, kylmäkuivaamalla, kuten edellä on jo todettu.



**Esimerkki 10** Sulfonointiasteen vaikutus heran proteiinien funktionaalisiin ominaisuuksiin

5 Samaa separoidusta edam-juuston valmistuksessa syntyneestä esiherasta valmistettua konsentraattia kuin esimerkissä 8, jonka proteiinipitoisuus oli 4,04 % (paino/tilavuus-%) sulfonoitiin 1,0 l samalla tavoin kuin esimerkissä 8. Tästä käytetään jatkossa nimeä erä 1. Toinen 1,0 l:n erä samaa herakonsentraattia sulfonoitiin samoin kuin esimerkissä 9. Tästä käytetään jäljempänä nimeä erä 2.

10 Molemmat erät 1 ja 2 konsentroitiin edelleen ultrasuodattamalla ja pestiin kolme kertaa omalla tilavuudellaan tislattua vettä. Pesun aikana ja pesun jälkeen konsentraatin pH pidettiin 6,5-7,0:ssa. Pesu tapahtui niin, että konsentraattiin lisättiin sama määrä tislattua vettä kuin konsentraatin tilavuus oli. Konsentraatin tilavuus kasvoi siis kaksinkertaiseksi. Ultrasuodatuksella suodatettiin lisättyä vesimäärää vastaava määrä suodosta konsentraatista pois, jolloin konsentraatin määrä oli taas alkuperäinen.

15 Tällä tavalla vähennettiin konsentraatin laktoosin ja sulfonoinnissa muodostuneiden suolojen määrää. Näin pystyttiin nostamaan myös konsentraatin proteiinipitoisuutta, kun ultrasuodatus helpottui.

20 Kylmäkuivauksen jälkeen pestyistä ja pH-vakioiduista konsentraateista saadut jauheet olivat koostumukseltaan seuraavanlaisia: erä 1, kuiva-aine 98,0 %, proteiini 77,8 % ja tuhka 5,0 % sekä erä 2, kuiva-aine 97,0 %, proteiini 77,0 % ja tuhka 6,2 %. Molempien erien proteiinijauheesta määritettiin funktionaalisena ominaisuutena vaahtoavuus ja vaahdon pysyvyys sekä geelityvyys sekä verrattiin tuloksia sulfonointiasteeseen suhteessa. Määritykset tehtiin Maatalouden tutkimuskeskuksen

25 Elintarvikkeiden tutkimuslaitoksen käyttämillä menetelmillä.

Vaahtoavuus määritettiin 150 ml:sta 3-%:ista proteiinijauheliuosta.

Erä	Vaahdon tilavuus ml	Vaahtoavuus-%	Pysyvyys min
1	2000	1230	21
2	2300	1430	27

30 Tulosten mukaan sulfonointiasteen nousu lisäsi vaahtoavuutta sekä vaahdon pysyvyyttä.

Geelityvyys määritettiin 10-%:isesta proteiinijauheliuoksesta kahdessa pH:ssa 6,50 ja 7,50.

Erä	pH	Geelityvyys	Väri
1	6,50	3,5	5
	7,50	3,5	5
2	6,50	4,0	5
	7,50	4,5	5

Tulosten mukaan sulfonointiasteen nousu paransi geelityvyyttä.

Geelityvyyden arvosteluasteikko:

- 5 5,0 Täydellinen geeli; kiinteä, joustava, leikattava ja pidättää hyvin vettä rakenteessa,  
 3,0 Selvä geelirakenne, jonkin verran hauras tai geelistä irtoaa vettä,  
 1,0 Geelimäistä rakennetta vielä nähtävissä,  
 0 Liuos tai saostuma

10

Geelin väri:

- 5,0 Valkoinen tai harmaa  
 3,0 Valkoisen ja täysin läpikuultavan välimuoto  
 1,0 Läpikuultava

#### 15 Menetelmän ydinprosessin suoritusmuoto

Eristysprosessin ydinosa on kuvattu kuvassa 1. Siinä juustonvalmistuksen sivutuotteena syntynyt hera johdetaan herasäiliöön 1. Prosessin tarvitsema hera otetaan säiliöstä ja siirretään reaktoriin 4. Herää ultrasuodatetaan proteiinipitoisuuden konsentroiduksi 4-7 %:ksi eli 8-16-kertaiseksi ja vähintään 75 % heran vedestä poistetaan. Suodatus tapahtuu ultrasuodatuslaitteella 6, jonka suodatuskalvojen pidätysarvo on noin 10 000 D. Herää suodatetaan niin kauan, kunnes tarvittava määrä halutun väkevyistä konsentraattia on reaktorissa. Ultrasuodatuksessa muodostunut suodos johdetaan suodossäiliöön 7. Suodos on prosessissa syntyvä käyttökelpoinen sivutuote.

- 25 Reaktorissa suoritetaan oksidatiivinen sulfitolyysi, jossa herakonsentraatin proteiinit sulfonoidaan halutunasteisesti. Sulfonointi voidaan toteuttaa kahtena reaktiona. Sulfitolyysissä sulfiitin sulfiitti-ionit aiheuttavat disulfidiryhmissä hapetus-pelkistysreaktion. Sen tuloksena toinen rikki hapettuu sulfonaattiryhmällä ja toinen rikki pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi. Hapetus tapahtuu lisäämällä reaktioon hapettavaa kemikaalia esimerkiksi kalsiumperoksidia, jolloin sulfhydryyliryhmät hapettuvat di-

sulfidiryhmiksi. Muodostuneet disulfidiryhmät jatkavat taas sulfiitti-ionien aiheuttamassa sulfitolyysissä niin kauan, kunnes jokin tekijä muodostuu rajoittavaksi.

- 5 Heraproteiinien oksidatiivisessa sulfitolyysissä käytetään seuraavia muuttujia ja niiden arvoja: herakonsentraatin proteiinipitoisuus 2-7 %, reaktiolämpötila 30-45°C, sulfiittipitoisuus 0,05-0,20 M, sulfitolyysin reaktio-pH 6,0-7,5, reaktioaika 10-60 min, hapettimen määrä 0,01-0,15 paino/tilavuus-% aktiivista happea, oksidaatio-pH 5,5-7,0, oksidaation reaktioaika 10-60 min.

Sulfonoinnissa tarvittavat reagenssit sulfiitti ja oksidantti, hapettava reagenssi, ovat saatavissa annosteltuina painon mukaan säiliöistä A ja B.

- 10 Sulfonoinnin jälkeen proteiinit saostetaan laskemalla pH-riittävästi happamen puolelle. Saostuksessa käytetyt muuttujat ja niiden arvot ovat: saostus-pH 3,5-5,5 ja saostusaika 10-60 min.

pH:n säätelyyn tarvittava happo ja emäs ovat käytettävissä säiliöissä 4a ja 5a.

- 15 pH:n laskun jälkeen vapautuu ylimääräisestä sulfiitista sekä sulfonaattiryhmistäkin rikkidioksidia, joka puhalletaan inertillä ja steriloidulla kaasulla säiliöstä 8 säiliöön 9. SO<sub>2</sub>:sta muodostunut rikkihapoke neutraloidaan NaOH:lla tavallisimmin NaHSO<sub>3</sub>:ksi. Tarvittava NaOH otetaan säiliöstä 5a.

- 20 Tämän jälkeen saostuma siirretään säiliöön 10, jossa se konsentroidaan ja pestään sentrifugoimalla separaattorilla 14. Pesty konsentraatti johdetaan säiliöön 13, josta se separaattorilla edelleen konsentroidaan proteiinitahnaksi. Tahnaksi konsentroidi voi tapahtua vaihtoehtoisesti suodattamalla esimerkiksi hihna- tai rumpusuodattimella. Tahnaa sekoitetaan ja sen pH säädetään halutuksi sekoittimessa 15. Pesty, valmiiksi sekoitettu ja pH-vakioitu proteiinitahna säilytetään kylmävarastossa 16.

- 25 Prosessin alkuosaa, heran proteiinien konsentroidintia ultrasuodatuksen avulla, voidaan käyttää halutun väkevyisen heraproteiinikonsentraatin tuottamiseen käytettäväksi mm. kastikkeisiin, kiisseleihin ja tiettyihin hapanmaitotuotteisiin. Reaktoriin 4 ultrasuodatuslaitteella 6 konsentroidu proteiinikonsentraatti siirretään säiliöön 10 ja sieltä edelleen käyttöpaikalle.

- 30 Ydinprosessissa olevat uutuudet, joita aiemmin ei ole käytetty vastaavissa yhteyksissä ovat: herakonsentraatin proteiinipitoisuus 4-7 %; reaktiolämpötila 30-50°C; oksidatiivisen sulfitolyysin hapettimena on käytetty reagenssia mm. CaO<sub>2</sub>; rikkidioksidin puhallus ja sen talteenotto, neutralointi ja uudelleenkäyttö; saostuman kon-

sentrointi ja pesu sentrifugoimalla separaattorilla sekä pestyn konsentraatin konsentroidi tahnaksi separaattorilla tai suodattamalla ja proteiinitahnan pH:n säätö ja sekoitus tasalaatuiseksi massaksi.

- 5 Lisäksi laitteiston yksinkertaisin proteiinien eristämisvaihtoehto on heran proteiinien konsentroidi haluttuun väkevyyteen ja sen käyttö sellaisenaan ilmenneisiin sovellustarpeisiin.

#### Ydinprosessin ensimmäinen laajennussuoritusmuoto ja parannukset

Ydinprosessia voidaan monipuolistaa ja parantaa tekemällä seuraavat lisäykset: Kuva 2.

- 10 Prosessin alussa ennen ultrasuodatusta on edullista mikrosuodattaa hera 0,22  $\mu\text{m}$ :n kalvoilla ultrasuodatuksen helpottamiseksi ja nopeuttamiseksi sekä heran laadun parantamiseksi. Mikrosuodatuksessa poistetaan herasta sinne jääneet kaseiinihiukkaset ja osa lipoproteiineista sekä vähennetään huomattavasti heran sisältämää bakteerimäärää tai poistetaan bakteerit kokonaan.

- 15 Mikrosuodatettaessa heraa säiliöstä 1 mikrosuodatinlaitteella 2 reaktoriin 4 muodostuu pidätteenä sivutuotetta säiliöön 3 edellä mainituista aineista, jotka ovat sopivia rehukäyttöön kuumennuksen jälkeen. Toisaalta lipoproteiinit ovat käyttökelpoisia luonnollisina emulgointiaineina jatkokäsiteltäviksi elintarvikekäyttöön.

- 20 Samanaikaisesti mikrosuodatuksen kanssa voidaan käynnistää ultrasuodatus ultrasuodatuslaitteella 6 heraproteiinien konsentroidimiseksi. Sivutuotteena syntynyt laktoosipitoinen ja proteiiniton suodos varastoidaan säiliöön 7. Suodos on hyvä raaka-aine mm. laktoosin eristämiseen ja laktoosin fermentoimiseen maitohapoksi tai etanoliksi.

- 25 Prosessin toimivuuden ja nopeuden kannalta on edullista lisätä prosessiin toinen reaktori 5. Suodatukset voidaan tehdä vuorotellen eli suodattaa toiseen sillä aikaa, kun toisessa sulfonoidaan ja saostetaan edellistä erää. Lisäreaktorin käytössä voidaan hyödyntää samoja jo olemassa olevia toimintoja kuin alkuperäisen reaktorin käytössä eli sulfonoinnissa tarvittavia reagensseja, reagenssisäiliöitä A ja B, pH:n säädössä tarvittavia happoja ja emäksiä, säiliöitä 4a ja 5a sekä rikkidioksidin puhalluksessa 30 tarvittavia kaasusäiliötä 8 sekä talteenottosäiliötä 9 lisälaitteineen.

Saosteen määrän lisääntyessä tarvitaan sen käsittelyyn tehokkaampia laitteita. Käsittely nopeutuu ja tehostuu huomattavasti, kun saostuman erotukseen käytetään mik-

rosuodatusta. Saostuma konsentroidaan ja pestään mikrosuodatinlaitteen 11 avulla säiliöön 10. Mikrosuodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön 12. Loput pesuvesistä johdetaan viemäriin. Pesty konsentraatti siirretään säiliöstä 10 säiliöön 13. Sieltä se voidaan konsentroida separaattorilla tai suodattamalla hihna- tai rum-  
5 pusuodattimella tahnaksi ja käsitellä edelleen kuten aiemmin on kuvattu.

Sulfonointiasteella ja saostus-pH:lla voidaan vaikuttaa proteiinien jakautumiseen saostuman ja liukoisen osan välille. Aina ei ole edullista saostaa mahdollisimman paljon proteiineista, vaan saattaa olla edullisempaa saostaa niistä vain tietty osa, koska näin saadaan koostumukseltaan halutunlaista proteiinia tiettyyn käyttötarkoi-  
10 tukseen. Tiettyjä proteiineja saostettaessa saattaa liukoiseen osaan jäädä vielä huomattava määrä käyttökelpoisia proteiineja. Näiden eristämiseksi säiliöön 12 varastoitu mikrosuodatuksen suodos ultrasuodatetaan ultrasuodatinlaitteella 17. Saostumattomat proteiinit konsentroidaan, pH nostetaan haluttuun arvoon NaOH:lla säiliöstä 5a ja pestään. Pesussa konsentraatista vähennetään tai poistetaan kokonaan lak-  
15 toosi ja käsittelyssä muodostuneet suolat NaCl ja CaCl<sub>2</sub>. Suodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön 18, josta niiden sisältämä laktoosi on hyödynnettävissä esimerkiksi käymisteitse. Loput pesuvedet johdetaan viemäriin. Pesty ja pH-vakioitu proteiinkonsentraatti johdetaan ultrasuodoskonsentraatin säiliöön 19. Sieltä se otetaan kuivattavaksi kuivaimeen 20. Kuivain voi olla suihke-, tyhjö- tai kylmäkuivain.  
20 Saatu proteiinijauhe säilytetään proteiinijauhevarastossa 21.

Haluttaessa valmistaa saostekonsentraatista jauhetta konsentraatti siirretään saostekonsentraatin säiliöstä 13 suodossäiliöön 12. Konsentraatin pH nostetaan haluttuun arvoon NaOH:lla säiliöstä 5a, ja konsentraatti pestään ultrasuodattamalla ultrasuodatinlaitteella 17. Tämän jälkeen konsentraatti siirretään säiliöön 19. Konsentraatin  
25 kuivaus tapahtuu samoin kuin edellä on kuvattu mikrosuodoskonsentraatin käsittelyn yhteydessä. Muodostunut proteiinijauhe säilytetään varastossa 21.

Haluttaessa konsentroitua heraa tiettyihin elintarvikkeisiin, kuten kastikkeisiin ja vanukkaisiin tai fermentoitaviin maitotuotteisiin, sen tuottaminen tapahtuu kuten edellä on kuvattu. Hera mikrosuodatetaan mikrosuodatuslaitteella 2 ensin ja mik-  
30 rosuodatuksen suodos konsentroidaan ultrasuodattamalla ultrasuodatuslaitteella 6 haluttuun proteiini- tai kuiva-ainekonsentraatioon. Konsentroidin jälkeen herakonsentraatti siirretään säiliöön 10 ja sieltä edelleen haluttuun käyttökohteeseen.

Toisinaan tarvitaan herakonsentraattia tai -jauhetta, josta on poistettu osittain tai kokonaan laktoosi ja suolat. Silloin säiliössä 10 oleva herakonsentraatti siirretään säiliöön 12 ja se pestään ultrasuodattamalla ultrasuodatuslaitteella 17 haluttuun puh-  
tauteen ja konsentroidaan haluttuun proteiinipitoisuuteen. Näin saatu konsentraatti  
5 siirretään säiliöön 19. Sieltä konsentraatti voidaan kuljettaa sellaisenaan käyttöpai-  
kalle tai kuivata kuivaimessa 20.

Ydinprosessin ensimmäisessä laajennuksessa ja parannuksessa ilmenevät uutuudet, joita aikaisemmin ei ole käytetty samassa yhteydessä: heran mikro-suodatus ennen konsentroidintia ultrasuodatuksella; kahden reaktorin käyttö sulfonoinnissa ja saostuk-  
10 sessa vuorotellen; saostuman erotus ja pesu mikro-suodattamalla; mikro-suodatuksen suodoksen konsentroidintia; pH:n säätö ja pesu ultrasuodattamalla; konsentraatin kui-  
vaus jauheeksi, edellisen toteutuksessa herakonsentraatin proteiinit jaettiin saosta-  
malla kahteen osaan, joiden määrä ja koostumus on säädeltävissä sulfonointiasteella ja saostus-pH:lla; saostuman kuivaus jauheeksi tahnan valmistuksen sijaan ja pestyn  
15 ja pH-vakioidun mikro-suodokonsentraatin kuivaus suihke-, tyhjö- ja kylmäkuivai-  
milla. Lisäksi laitteistoa voidaan käyttää mikro-suodatetun ja ultrasuodatuksella kon-  
sentroidun herakonsentraatin valmistukseen sekä herakonsentraatin valmistukseen, josta on poistettu laktoosi ja suolat osittain tai kokonaan. Kaikki edellä mainitut tuotteet voivat olla liuoksena tai kuivattuina.

## 20 Ydinprosessin toinen laajennussuoritusmuoto ja parannukset

Herakonsentraatin proteiinit ovat jaoteltavissa sulfonoinnin jälkeen useampaan osaan kuin vain kahteen, saostumaan ja liukoiseen osaan. Vaihtelemalla sulfonointi-  
astetta ja saostus-pH:ta voidaan konsentraatin proteiinit saostaa useana eri osana, jolloin saostumien ja liukoisen osan proteiinikoostumus ovat määriteltävissä suhteel-  
25 lisen tarkasti. Ks. kuva 3.

Prosessin alkuosa on samanlainen kuin ensimmäisessä laajennuksessa. Haluttu sul-  
fonointiaste voidaan määritellä tarkasti edellä esitetyillä sulfonointiin vaikuttavilla  
30 tekijöillä. Saostamiset puolestaan voidaan tehdä esimerkiksi kolmessa pH:ssa 5,0, 4,5 ja 4,0. Ensimmäisen saostamisen pH:ssa 5,0 saostuma erotetaan mikro-suodatta-  
malla säiliöön 10. Mikro-suodos johdetaan suoraan tai suodossäiliön 12 kautta ta-  
kaisin toiseen reaktoriin seuraavaa saostamista varten pH:ssa 4,5. Tarvittaessa mik-  
ro-suodatuksen suodos on konsentroitavissa säiliössä 12 käyttämällä ultrasuodatinta  
17 ennen seuraavaa saostamista.

Toista saostamista tehtäessä pestään säiliössä 10 oleva saostekonsentraatti mikro-suodattamalla. Pesty konsentraatti siirretään säiliöön 13 tai 12 ilman pesua jatkatta-  
essa käsittelyä välittömästi. Säiliössä 12 konsentraatin pH nostetaan haluttuun ar-  
voon NaOH:lla säiliöstä 5a. Konsentraatti pestään ultrasuodattamalla ultrasuodatti-  
5 messa 17 ja väkevöidään sopivalle tasolle. Käsittelyn jälkeen konsentraatti siirretään  
säiliöön 19, josta se kuivataan, kuten edellä on selostettu tai käytetään sellaisenaan  
kuljetettuna suoraan käyttökohteeseen.

Toinen ja kolmas saostus edellä mainituissa pH:issa sekä saostuman käsittely kon-  
sentraatiksi tai kuivatuksi jauheeksi suoritetaan samoin kuin ensimmäisen saostuk-  
10 sen yhteydessä on kuvattu.

Viimeisen saostuksen suodos konsentroidaan, sen pH säädetään haluttuun arvoon ja  
se pestään. Pesty konsentraatti voidaan käyttää sellaisenaan tai kuivataan kuten edel-  
lä on kuvattu.

Ydinprosessin toisen laajennuksen yhteydessä käyttöön otetut uutuudet, joita aikai-  
15 semmin ei ole käytetty samassa yhteydessä ovat: herakonsentraatin proteiinit ovat  
jaoteltavissa useaan osaan eri käyttötarkoituksia varten saostamalla useassa pH:ssa,  
suodos on konsentroitavissa ennen seuraavaa saostusta, ja prosessin laitteistolla on  
suoritettavissa useita toimintoja samanaikaisesti, esimerkiksi saostaminen voidaan  
suorittaa samaan aikaan, kun edellistä saostumaa pestään mikrosuodatuksella tai sitä  
20 edellistä pestään ja konsentroidaan pH:n säädön yhteydessä ultrasuodatuksella en-  
nen kuivausta.

Kaikki jaottelussa tuotetut proteiinit ja niiden seokset ovat valmistettavissa ja saata-  
vissa myös liukoisina.

Heran proteiinit ovat tunnetusti hyviä biologiselta arvoltaan. Saadut proteiinijakeet  
25 voidaan kohdentaa hyvin vaativiin erikoisruokiin, kuten  $\alpha$ -laktalbumiini lastenruo-  
kiin (mm. Hambræus, Proceedings of the International Congress on Milk Proteins  
1984, s. 63-79). Saostamisen yhteydessä pH lasketaan arvoon 5,0 ja sen alapuolelle,  
jolloin käytetyssä reaktiolämpötilassa rikkidioksidi vapautuu mm. sulfoniryhmistä  
( $-S-SO_3^-$ ) ja muodostuu vapaita sulfhydryyliryhmiä ( $-SH$ ). Sulfhydryyliryhmät py-  
30 syvät vapaina, ellei pH:ta nosteta lähelle 7:ää ja anneta hapen vaikuttaa niihin. Sulf-  
hydryyliryhmät suojaavat monia ruoissa esiintyviä, raaka-aineissa olevia tai valmis-  
tuksessa syntyneitä, epäedullisia, jopa myrkyllisiä yhdisteitä, mm. mykotoksiinit ja  
lysinoalaniini, vastaan (mm. Friedman, J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 3-20). Pro-  
teiinien fraktioinnissa biologinen arvo ja ravintonäkökohdat ovat useimmiten ensisi-

jaisia. Lisäksi sulfonointiasteesta johtuvia toiminnallisia ominaisuuksia voidaan jossain määrin hyödyntää näissäkin yhteyksissä. Toisaalta eräiden proteiinien kuten  $\beta$ -laktoglobuliinin eristämisessä yhtenä näkökohtana on hyvät geelilytymisominaisuudet.

5

### Ydinprosessin kolmas laajennussuoritusmuoto ja parannukset

Heran kokonaisproteiinien toiminnallisuuteen voidaan vaikuttaa sulfonointiasteella biologisen arvon huonontumatta. Sulfonointiasteen lisäyksellä, jonka seurauksena

10 molekyyliarakenteen muuntuneisuus lisääntyy, vaikutetaan heran proteiinien moniin toiminnallisiin ominaisuuksiin joko parantamalla tai huonontamalla niitä. Tällaisia ominaisuuksia ovat mm. vaahtoavuus, vaahton pysyvyys, viskositeetti, liukoisuus, emulgointikyky ja geelilytyvyys (mm. N.K.D. Kella, S.T. Yang & J.E. Kinsella 1989, J. Agric. Food Chem. 37, 1203-1210).

15 Proteiinien molekyyliarakenteen pysyvyys edellyttää sulfoniryhmien olemassaoloa rakenteessa. Tämän seurauksena happamien olosuhteiden käyttö ei tule kysymykseen eristyksessä, joten eristysprosessin alkuosaa voidaan käyttää vain saostamiseen asti. Ks. kuva 4.

Valmistettaessa muunneltuja proteiineja, joiden tiettyjen hyvien toiminnallisten

20 ominaisuuksien halutaan säilyvän, konsentraatti siirretään sulfonoinnin jälkeen säiliöön 10, jossa se tarvittaessa voidaan mikrosuodattaa, ja sen jälkeen säiliöön 12, jossa se puolestaan konsentroidaan, sen pH säädetään ja pidetään välillä 6-8, edullisimmin 6,5-7,5, ja pestään ultrasuodattamalla ultrasuodatinlaitteella 17. Pesty ja pH-vakioitu konsentraatti siirretään säiliöön 19, josta se kuljetetaan sellaisenaan käyttö-

25 paikalle tai johdetaan kuivaimeen 20 kuivausta varten. Valmis tuote, proteiinijauhe, varastoidaan varastoon 21.

Ultrasuodatuksessa syntynyt suodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön

18. Muut pesuvedet johdetaan viemäriin. Säiliössä 18 oleva suodos ja pesuvedet johdetaan vapaaseen reaktoriin, sen pH lasketaan 4,5:een ja se lämmitetään tavallisesti käytettyyn prosessilämpötilaan. Näissä olosuhteissa puhalletaan vapautunut rikkidioksidi inertillä ja steriloidulla kaasulla säiliöstä 8 talteenottosäiliöön 9, jossa se neutraloidaan  $\text{NaHSO}_3$ :ksi  $\text{NaOH}$ :lla säiliöstä 5a. Käsitelty suodos siirretään säiliöön 18 hyödynnettäväksi esimerkiksi fermentoimalla.

30

Proteiinien allergeenisia ominaisuuksia voidaan jossain määrin vähentää lyhentämällä peptidien pituutta. Myös proteiinien toiminnallisia ominaisuuksia voidaan

35



tietyissä määrin muunnella pienentämällä molekyylien kokoa. Prosessiin on sijoitettu membraanireaktori 22 proteiinien entsyymaattista hydrolyysiä varten. Membraanireaktorissa proteiinit ovat hydrolysoitavissa halutun kokoisiksi peptideiksi ennen kuivausta tai käyttöä sellaisenaan.

- 5 Ydinprosessin kolmannessa laajennuksessa käyttöön otetut uutuudet ovat: halutussa määrin sulfonoitu konsentraatti tarvittaessa mikrosuodatetaan ja suodatettu konsentraatti konsentroidaan edelleen ultrasuodattamalla, sen pH säädetään halutuksi ja se pestään; proteiinien molekyylikokoa voidaan toiminnallisten ominaisuuksien tai muiden syiden vaatiessa pienentää hydrolysoimalla ennen kuivausta. Hydrolysaatti on käytettävissä myös liuoksena.

- Pääosa edellä esitellyistä uutuuksista on esitetty edellisessä menetelmää koskevassa patenttihakemuksessa, mutta tietyt tärkeät menetelmän osat ovat uusia ja luetellaan jäljempänä. Tässä hakemuksessa kuvataan uutuutena menetelmän toteuttamiseen tarvittava väline, valmistusprosessi. Tähän hakemukseen kuuluu useamman pH:n saostus fraktiointimielessä ja fraktioiden tuottaminen liuoksina tai kuivattuna sekä sulfonoidun konsentraatin mikrosuodatus ja sen jälkeen konsentroidi, pH:n vakiointi ja pesu ennen tuotteeksi saattamista liuoksena tai kuivattuna jauheena. Saostus jää siis kokonaan pois. Kysymyksessä on heran koko proteiiniosan tiettyjen toiminnallisten ominaisuuksien parantaminen. Menetelmän osana on mukana proteiinien entsyymaattinen hydrolysointi peptidikoon pienentämiseksi ennen konsentraatin tuotteeksi saattamista liuoksena tai kuivattuna jauheena.

#### Selitykset kuvien 1-4 prosessikaavioihin

1. Heran varastosäiliö: Hera johdetaan herasäiliöön juustonvalmistuksesta rasvan poiston jälkeen.
- 25 2. Mikrosuodatuslaitteisto: Herasta suodatetaan pois mikrosuodatuksella kaseiinihiukkaset, bakteerit ja osa fosfolipoproteiineja pidätteenä.
3. Pidätesäiliö: Pidäte johdetaan erilliseen säiliöön.
- 4 ja 5. Reaktorit: Mikrosuodatuksen suodos johdetaan vuorotellen molempiin reaktoreihin, joissa se väkevöidään ultrasuodattamalla. Reaktoreissa tapahtuu proteiinien muuntelu sulfonoimalla ja saostus.
- 30 4a ja 5a. Happo- ja emässäiliöt pH:n säätölaitteineen: Säiliöt sisältävät happoa ja emästä pH:n muutosta ja tasausta varten.

A ja B. Reagenssien 1 ja 2 säiliöt ja annostelulaitteisto: Säiliöt sisältävät reagensseja 1 ja 2, joita käytetään proteiinien muuntelussa. Säiliöiden yhteydessä on myös reagenssien annostelulaitteet.

5 6. Ultrasuodatuslaitteisto: Mikro-suodatuksen suodos väkevöidään ultrasuodattamalla reaktoreihin.

7. Suodossäiliö: Ultrasuodatuksen suodos johdetaan sivutuotteena suodossäiliöön jatkotoimenpiteitä varten.

10 8. Kaasusäiliö: Rikkidioksidin puhallus tapahtuu puhaltamalla reaktoreihin steriiliä inerttiä kaasua, ilmaa/typeä, jolla ajetaan vapautunut rikkidioksidi ulos saosteesta.

9. Rikkidioksidin talteenottosäiliö: Puhallettu kaasu ja sen mukana tuleva vesihöyry sekä  $\text{SO}_2/\text{SO}_3^{2-}$  otetaan talteen uudelleenkäyttöä varten. Näin estetään  $\text{SO}_2$ :ta joutumasta ympäristöön ja suodoksen jatkokäsittelyssä aiheuttamasta vahinkoa mm. hyötymikrobeille.

15 10. Saostesäiliö: Reaktoreista saoste johdetaan saostesäiliöön, johon se konsentroidaan mikro-suodattamalla.

11. Mikro-suodatuslaitteisto: Saoste konsentroidaan ja pestään mikro-suodattamalla. Konsentraatti muodostuu saostesäiliöön 10 ja suodos sekä ensimmäiset pesuvedet johdetaan suodossäiliöön 12. Toiset pesuvedet johdetaan viemäriin.

20 12. Suodossäiliö: Saosteen mikro-suodatuksessa muodostunut suodos johdetaan suodossäiliöön.

13. Saostekonsentraation säiliö: Väkevöity saoste johdetaan saostekonsentraatin säiliöön, josta se otetaan jatkokäsittelyyn, separointiin, tai siirretään ultrasuodatuksen, säiliöön 12.

25 14. Sentrifugi, separaattori: Saostekonsentraatti sentrifugoidaan, separoidaan, proteiinien erottamiseksi tahnana. Proteiinit siirretään sekoittimeen 15 ja kirkaste päästetään viemäriin.

15. Sekoitin: Proteiinitahnaa sekoitetaan sekoittimessa ja samassa yhteydessä sen pH nostetaan haluttuun arvoon.

30 16. Tuotevarasto: Valmis ja vakioitu proteiinitahna siirretään varastoon 16.

17. Ultrasuodatuslaitteisto: Mikrosuodatussuodoksen väkevöinti, pH:n säätö ja pesu tapahtuvat ultrasuodattamalla säiliöön 12.
18. Ultrasuodossäiliö: Ultrasuodatuksen suodos ja ensimmäiset pesuvedet johdetaan säiliöön 18. Seuraavat pesuvedet päästetään viemäriin.
- 5 19. Ultrasuodatuskonsentraatin säiliö: Ultrasuodatuskonsentraatti siirretään suodossäiliöstä 12 konsentraattisäiliöön 19.
20. Kuivain: Kyseeseen tulee suihke-, tyhjö- tai kylmäkuivain. Sillä kuivataan ultrasuodatuskonsentraatti proteiinijauheeksi.
21. Proteiinijauhevarasto: Proteiinijauhe varastoidaan jatkokäsittelyä varten.
- 10 22. Membraanireaktori proteiinihydrolyysiä varten: Ultrasuodatus- ja saostekonsentraatti sekä muut proteiinit voidaan hydrolysoida halutun kokoisiksi peptideiksi ennen kuivaamista.
23. Hydrolysaatin varastosäiliö: Hydrolysaatti varastoidaan ennen kuivausta tai käyttöä.

### Patenttivaatimukset

1. Prosessi pääasiassa vettä, laktoosia ja proteiineja sisältävän heran proteiinien eristämiseksi, joka sisältää vaiheet, joissa

- 5 a) suoritetaan heran esikäsitteily, joka ainakin käsittää heran konsentroinnin poistamalla siitä noin 75-95 % sen vedestä,
- b) suoritetaan vaiheen a) esikäsitellyn heran sulfonointikäsitteily, ja
- 10 c) suoritetaan vaiheen b) esi- ja sulfonointikäsitellyn heran loppukäsitteily, joka ainakin käsittää heran sulfonoitujen proteiinien erottamisen em. käsitellystä herasta konsentroimalla ne, saostamalla ne ja/tai suorittamalla niille fraktiosaostus,
- 10 **tunnettu** siitä, että esikäsitellyn heran sulfonointikäsitteily b) suoritetaan siten, että esikäsitelty hera saatetaan kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuksen hapettavan yhdisteen kanssa ilman katalyysaattoria ja heran proteiinit sulfonoituvat.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että vaihe b) käsittää toisistaan riippumatta sen, että

- 15 - käytetään sulfiittina alkalimetallin ja/tai maa-alkalimetallin sulfiittia, vetysulfiittia ja/tai metabisulfiittia, edullisesti natriumsulfiittia, natriumvetysulfiittia ja/tai natriummetabisulfiittia, edullisimmin natriumvetysulfiittia,
- 20 - käytetään sellaista sulfiittimäärää, että sulfiitin konsentraatio sulfonointiseoksessa on välillä noin 0,02-0,20 M, edullisesti välillä noin 0,05-0,10 M,
- käytetään elintarvikelaatuksena hapettavana yhdisteenä elintarvikelaatuista peroksidiyhdistettä ja/tai halogenaattia, edullisesti vastaavasti kalsiumperoksidia  $\text{CaO}_2$  ja/tai kaliumbromaattia  $\text{KBrO}_3$ , ja että
- 25 - käytetään sellaista elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä, että elintarvikelaatuksen hapettavan yhdisteen pitoisuus on välillä 0,01-0,15 % (paino/tilavuus), laskettu aktiivisena happena, ja lisäksi sen, että
- saatetaan esikäsitelty hera kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuksen hapettavan yhdisteen kanssa pH:ssa noin 5,0-8,5 ja
- 30 - saatetaan esikäsitelty hera kosketukseen sulfiitin ja elintarvikelaatuksen hapettavan yhdisteen kanssa lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti lämpötilassa noin 30-50°C.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että vaiheen b) sulfonointikäsitteily käsittää vaiheet, joissa:

- 35 b<sub>1</sub>) proteiinit sulfonoidaan saattamalla esikäsitelty hera kosketukseen sulfiitin kanssa ja

b<sub>2</sub>) sulfonoidut proteiinit hapetetaan saattamalla ne kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että vaihe b<sub>1</sub>) käsittää toisistaan riippumatta sen, että
- saatetaan esikäsitelty hera kosketukseen sulfiitin kanssa pH:ssa noin 6,0-7,5, edullisesti pH:ssa noin 6,5-7,0,
  - saatetaan esikäsitelty hera kosketukseen sulfiitin kanssa noin 10-50 minuutin ajan, ja
- 10 - saatetaan esikäsitelty hera kosketukseen sulfiitin kanssa lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti noin 30-50°C, ja vaihe b<sub>2</sub>) käsittää toisistaan riippumatta sen, että
- saatetaan sulfonoidut proteiinit kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa pH:ssa noin 5,0-7,0, edullisesti pH:ssa noin 5,5-6,5,
  - saatetaan sulfonoidut proteiinit kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa noin 15-60 minuutin ajan, ja
- 15 - saatetaan sulfonoidut proteiinit kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti noin 30-50°C.

5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että vaihe c) käsittää sulfonoitujen proteiinien erottamisen esikäsitelystä herasta lisä-
- 20 konsentroimalla, edullisesti ultrasuodattamalla ja edullisesti pH:ssa 6-8, jolloin saadaan talteen oleellisesti kaikki sulfonoidut proteiinit yhdessä käsittävä konsentraatti.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen prosessi, **tunnettu** siitä, että vaihe c) käsittää toisistaan riippumatta
- 25 - käsittelystä herassa olevien sulfonoitujen proteiinien puhdistamisen mikrosuodatuksella, edullisesti ennen konsentrointia,
- konsentraatin hydrolysoinnin, edullisesti entsyymaattisesti, jolloin syntyy kokoheraproteiinihydrolysaattia,
- 30 - konsentroimalla käsitelystä herasta erotettujen sulfonoitujen proteiinien tai niiden hydrolysoinnista syntyvän kokoheraproteiinihydrolysaatin kuivaamisen kiinteäksi tuotteeksi,
- rikkijohdannaisten poistamisen käsitelystä herasta, josta sulfonoidut proteiinit on erotettu, alentamalla pH, edullisesti  $\leq 5$ , ja lämmittämällä, edullisesti lämpötilaan
- 35 noin 30-50°C, jolloin rikkioksidijohdannaiset muuttuvat rikkidioksidikaasuksi, joka poistetaan ja edullisesti neutraloidaan prosessissa käyttökelpoiseksi sulfiitiksi kuten natriumvetysulfiitiksi.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää sulfonoitujen proteiinien erottamisen käsitellystä herasta saostamalla happamassa pH:ssa, jolloin syntyvä sakka sisältää ko. pH:ssa liukenemattomat proteiinit (esim.  $\alpha$ -laktalbumiini, naudanseerumialbumiini BSA) ja jäävä vesifaasi sisältää ko. pH:ssa liukoiset proteiinit (esim.  $\beta$ -laktoglobuliini), ja erottamalla sakka vesifaasista.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että sakka erotetaan sentrifugiseparaattorilla.

10

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää toisistaan riippumatta sen, että

- erotetaan sulfonoidut proteiinit saostamalla pH:ssa noin 2,5-6,5, edullisesti pH:ssa noin 3,0-5,0,

15 

- erotetaan sulfonoidut proteiinit saostamalla lämpötilassa noin 25-55°C, edullisesti lämpötilassa noin 30-50°C,

- erotetaan sulfonoidut proteiinit siirtymällä hitaasti, edullisesti 10-40 minuutin aikana, vaiheen b) pH-arvosta vaiheen c) sulfonoitujen proteiinien saostus-pH-arvoon, edullisesti viimeksi mainitun pH-arvon alarajaan,

20 

- suoritetaan saosteen sekoitus pH:n happamaksi säätämisen jälkeen, edullisesti noin 10-60 min, ja että

- happamassa pH:ssa oleva saoste (sakka + vesifaasi) konsentroidaan mikrosuodattamalla, edullisesti ennen sakan eristämistä saosteesta tai sen konsentraatista toisella menetelmällä, jolloin sakka erottuu ainakin osasta käsiteltyä heraa.

25

10. Patenttivaatimuksen 8 tai 9 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe b) ja vaihe c) käsittävät sulfonoitujen proteiinien erottamisen saostamalla happamassa pH:ssa vuorotellen vähintään kahdessa astiassa, edullisesti siten, että vaihe b) ja vaihe c) tehdään kahdessa astiassa vuorotellen, tai siten, että vaiheiden b) ja c) täyttö-, tyhjennys- ja erotusoperaatiot vuorottelevat vaiheiden pääoperaatioiden (sulfonointi, saostus) kanssa tai siten, että erotusoperaatio vuorottelee em. pääoperaatioiden muodostaman peräkkäiskokonaisuuden kanssa.

30

11. Jonkin patenttivaatimuksista 8-10 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää saostuksen happamassa pH:ssa, vapautuvan rikkidioksidin erottamisen ja talteenoton, edullisesti johtamalla saostusseokseen inerttikaasua, joka kuljettaa rikkidioksidin säiliöön, jossa se muutetaan rikkihapokkeeksi ja mielellään neutraloi-

35

daan, mieluummin NaOH:lla prosessissa uudelleen käyttökelpoiseksi NaHSO<sub>3</sub>:ksi, joka syötetään sulfiitiksi takaisin vaiheeseen b).

12. Jonkin patenttivaatimuksista 8-11 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää ainakin yhden seuraavista loppukäsittelyvaiheista

- saoste tai sen pesty konsentraatti konsentroidaan proteiinitahnaksi, edullisesti käyttäen sentrifugiseparaattoria, hihnasuodatinta ja/tai rumpusuodatinta ja valinnaisesti,

- proteiinitahnaa sekoitetaan ja/tai säädetään sen pH:ta, edullisesti arvoon 6-8 emäksellä tai emäseoksella, joka edullisesti on NaOH tai NaOH:n, Ca(OH)<sub>2</sub>:n ja KOH:n seos, jolloin CaOH:n määrä edullisimmin on sellainen, että se korvaa vähintään heran alkuperäisen Ca:n määrän,

- saostuksen ja sakan erotuksen jälkeisen suodoksen sisältämien ko. pH:ssa liukoisten sulfonoitujen proteiinien (esim. β-laktoglobuliini) talteenoton, edullisesti ultra-suodatuksella, ja mahdollisen jatkokäsittelyn, kuten konsentroinnin, pH-säädön, pesun hydrolyysin ja/tai kuivauksen.

13. Jonkin patenttivaatimuksista 8-12 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää sulfonoitujen proteiinien erottamisen käsitelystä herasta ja toisistaan

fraktiosaostamalla useassa happamassa pH:ssa, jolloin ensimmäisessä saostuksessa ensimmäisessä happamassa pH:ssa syntyvä sakka, joka sisältää ko. pH:ssa liukene-mattomat proteiinit, erotetaan, edullisesti sentrifugoimalla ja/tai mikrosuodattamalla, ja otetaan talteen, ja ko. pH:ssa syntyvälle vesifaasille eli suodokselle tai sen konsentraatille, joka sisältää ko. pH:ssa liukoiset proteiinit, suoritetaan toinen saostus toisessa happamassa pH:ssa, erotetaan ja otetaan talteen, jne., kunnes saadaan talteen kutakin hapanta saostus-pH:ta vastaavat sakat, joissa on vastaavat proteiinit, ja kaikkien saostuksien jälkeen jäävä vesifaasi, jossa on kaikissa saostus-pH:issa liukoisena säilyneet proteiinit, jotka voidaan eristää konsentroimalla ja kuivaamalla.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen prosessi, tunnettu siitä, että vaihe c) käsittää sulfonoitujen proteiinien erottamisen saostamalla kahdessa tai kolmessa happamassa, edullisesti alenevassa pH:ssa, edullisesti pH:ssa noin 5,0, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä α-laktalbumiinista, pH:ssa noin 4,5, jolloin saostuu esim. oleellinen osa heran sisältämästä naudanseerumialbumiinista (BSA), ja pH:ssa noin 4,0, jolloin saostuu esim. loput naudanseerumialbumiinista ja muut happamassa saostuvat proteiinit, mainitussa järjestyksessä, jolloin jäljelle jää vesifaasi eli käsitellyn heran se osa, jossa on ainakin ko. kolmessa saostus-pH:ssa liukoisena säilyneet proteiinit, esim. β-laktoglobuliini.

**Patentkrav**

1. Process för isolering av proteiner ur vassla som innehåller huvudsakligen vatten, laktos och proteiner, innehållande stegen där
  - a) vasslan förbehandlas, vilket åtminstone innefattar koncentration av vasslan genom avlägsning av 75-95 % av dess vatten,
  - b) den förbehandlade vasslan ur steg a) sulfoneringsbehandlas, och
  - c) den för- och sulfoneringsbehandlade vasslan ur steg b) behandlas, varvid vasslans sulfonerade proteiner åtminstone separeras ur ovannämnda behandlade vassla genom koncentration, utfällning och/eller fraktionsutfällning av dessa,
- 10 **kännetecknad** av att sulfoneringsbehandlingen b) av den förbehandlade vasslan genomförs så, att den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfid och en oxiderande förening av livsmedelskvalitet utan katalysator, varvid vasslans proteiner sulfoneras.
- 15 2. Process enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att steg b) innefattar oberoende av varandra det, att
  - som sulfid används en alkalimetall- och/eller alkalisk jordartsmetallsulfid, en vätesulfid och/eller metabisulfid, företrädesvis natriumsulfid, natriumvätesulfid och/eller natriummetabisulfid, helst natriumvätesulfid,
  - 20 - en sådan mängd sulfid används, att sulfidkoncentrationen i sulfoneringsblandningen är mellan cirka 0,02-0,20 M, företrädesvis mellan cirka 0,05-0,10 M,
  - som den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet används en peroxidförening och/eller ett halogenat av livsmedelskvalitet, företrädesvis kalciumperoxid  $\text{CaO}_2$  och/eller kaliumbromat  $\text{KBrO}_3$ , och att
  - 25 - en sådan oxiderande förening av livsmedelskvalitet används, att halten av oxiderande förening av livsmedelskvalitet är 0,01-0,15 % (vikt/volym), räknat som aktivt syre, och dessutom att
  - den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiden och den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i ett pH-värde om cirka 5,0-8,5 och
  - 30 - den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiden och den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i en temperatur om cirka 25-55°C, företrädesvis temperaturen cirka 30-50°C.
3. Process enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknad** av att stegets b) sulfoneringsbehandling innefattar stegen där:
  - 35 b<sub>1</sub>) proteinerna sulfoneras genom att bringa den förbehandlade vasslan i kontakt med sulfiden och
  - b<sub>3</sub>) de sulfonerade proteinerna oxideras genom att bringa dem i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet.



4. Process enligt patentkrav 3, kännetecknad av att steg b<sub>1</sub>) innefattar oberoende av varandra att

- den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten i ett pH av cirka 6,0-7,5, företrädesvis pH-värdet cirka 6,5-7,0,

5 - den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten i cirka 10-50 minuter, och

- den förbehandlade vasslan bringas i kontakt med sulfiten i en temperatur av cirka 25-55°C, företrädesvis cirka 30-50°C, och b<sub>2</sub>) innefattar oberoende av varandra att

10 - de sulfonerade proteinerna bringas i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i ett pH av cirka 5,0-7,0, företrädesvis i ett pH av cirka 5,5-6,5,

- de sulfonerade proteinerna bringas i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i cirka 15-60 minuter, och

- de sulfonerade proteinerna bringas i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet i en temperatur av cirka 25-55°C, företrädesvis cirka 30-50°C.

15

5. Process enligt något av de föregående patentkraven, kännetecknad av att steg c) innefattar separering av de sulfonerade proteinerna från den förbehandlade vasslan genom vidarekoncentrering, företrädesvis ultrafiltrering och företrädesvis vid ett pH av 6-8, varvid ett koncentrat tillvaratages som innehåller väsentligen alla sulfonerade proteiner.

20

6. Process enligt patentkrav 5, kännetecknad av att steg c) innefattar oberoende av varandra

- en rening av de i vasslan befintliga sulfonerade proteiner genom mikrofiltrering, företrädesvis före koncentreringen,

25

- en hydrolysering, som företrädesvis är enzymatisk, av koncentratet, varvid helvassleproteinhydrolysat bildas,

- koncentrering av de ur den behandlade vasslan separerade sulfonerade proteinerna eller det ur deras hydrolysering bildade helvassleproteinhydrolysatet genom torkning till en torr produkt,

30

- avlägsning av svavelderivat ur den behandlade vasslan från vilken de sulfonerade proteinerna separerats, genom sänkning av pH-värdet, företrädesvis  $\leq 5$ , och genom uppvärmning, företrädesvis till temperaturen cirka 30-50°C, varvid svaveloxidderivaten konverteras till svaveldioxidgas som avlägsnas och företrädesvis neutraliseras till i processen användbar sulfit såsom natriumvätesulfid.

35

7. Process enligt något av patentkraven 1-4, kännetecknad av att steg c) innefattar separering av de sulfonerade proteinerna ur den behandlade vasslan genom utfällning i sur pH, varvid den erhållna fällningen innehåller vid nämnda pH olösliga proteiner (t.ex.  $\alpha$ -laktalbumin, boskapsserumalbumin (BSA) och den åter-

stående vattenfasen innehåller vid nämnda pH lösliga proteiner (t.ex.  $\beta$ -laktoglobulin), och genom separering av fällningen ur vattenfasen.

5 8. Process enligt patentkrav 7, kännetecknad av att fällningen separeras medelst en centrifugseparator.

9. Process enligt patentkrav 8, kännetecknad av att steg c) innefattar oberoende av varandra att

10 - de sulfonerade proteinerna separeras genom utfällning vid pH-värdet cirka 2,5-6,5, företrädesvis pH-värdet cirka 3,0-5,0,

- de sulfonerade proteinerna separeras genom utfällning vid temperaturen cirka 25-55°C, företrädesvis temperaturen cirka 30-50°C,

15 - de sulfonerade proteinerna separeras genom långsam övergång, företrädesvis under 10-40 minuter, från stegets b) pH-värde till stegets c) pH-värde för utfällning av de sulfonerade proteinerna, företrädesvis till den nedre gränsen av sistnämnda pH-värdet,

- en blandning av utfällningen efter inställningen av surt pH genomförs, företrädesvis under cirka 10-60 minuter, och att

20 - den vid surt pH befintliga utfällningen (fällningen + vattenfasen) koncentreras genom mikrofiltrering, företrädesvis före isolering av fällningen ur utfällningen eller dess med en andra metod erhållna koncentrat, varvid fällningen separeras från åtminstone en del av den behandlade vasslan.

10. Process enligt patentkrav 8 eller 9, kännetecknad av att steg b) och steg c) innefattar separering av de sulfonerade proteinerna genom utfällning vid surt pH

25 turvis i åtminstone två kärl, företrädesvis så, att steg b) och steg c) utförs turvis i två kärl, eller så, att stegens b) och c) fyllnings-, tömnings- och separeringsoperationer turas om med stegens huvudoperationer (sulfonering, utfällning) eller så, att separeringsoperationen turas om med en successiv helhet bestående av nämnda huvudoperationer.

30

11. Process enligt något av patentkraven 8-10, kännetecknad av att steg c) innefattar en utfällning vid surt pH, en separering och tillvaratagning av den frigjorda svaveldioxiden, företrädesvis genom att i utfällningsblandningen leda inertgas, som

35 transporterar svaveldioxiden till en behållare, där den konverteras till svavelsyrlighet och gärna neutraliseras, helst med NaOH till i processen återanvändbart NaHSO<sub>3</sub>, vilket återmatas som sulfit till steg b).

12. Process enligt något av patentkraven 8-11, kännetecknad av att steg c) innefattar åtminstone ett av följande slutbehandlingssteg

- utfällning eller ett tvättat koncentrat därav koncentreras till proteinpasta, företrädesvis medelst en centrifugseparator, ett remfilter och/eller ett trumfilter och eventuellt,

- proteinpastan blandas och/eller regleras till önskat pH, företrädesvis till värdet 6-8 medelst en bas eller basblandning, som företrädesvis är NaOH eller en blandning av NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  och KOH, varvid mängden CaOH helst är sådan, att den åtminstone ersätter vasslans ursprungliga mängd Ca,

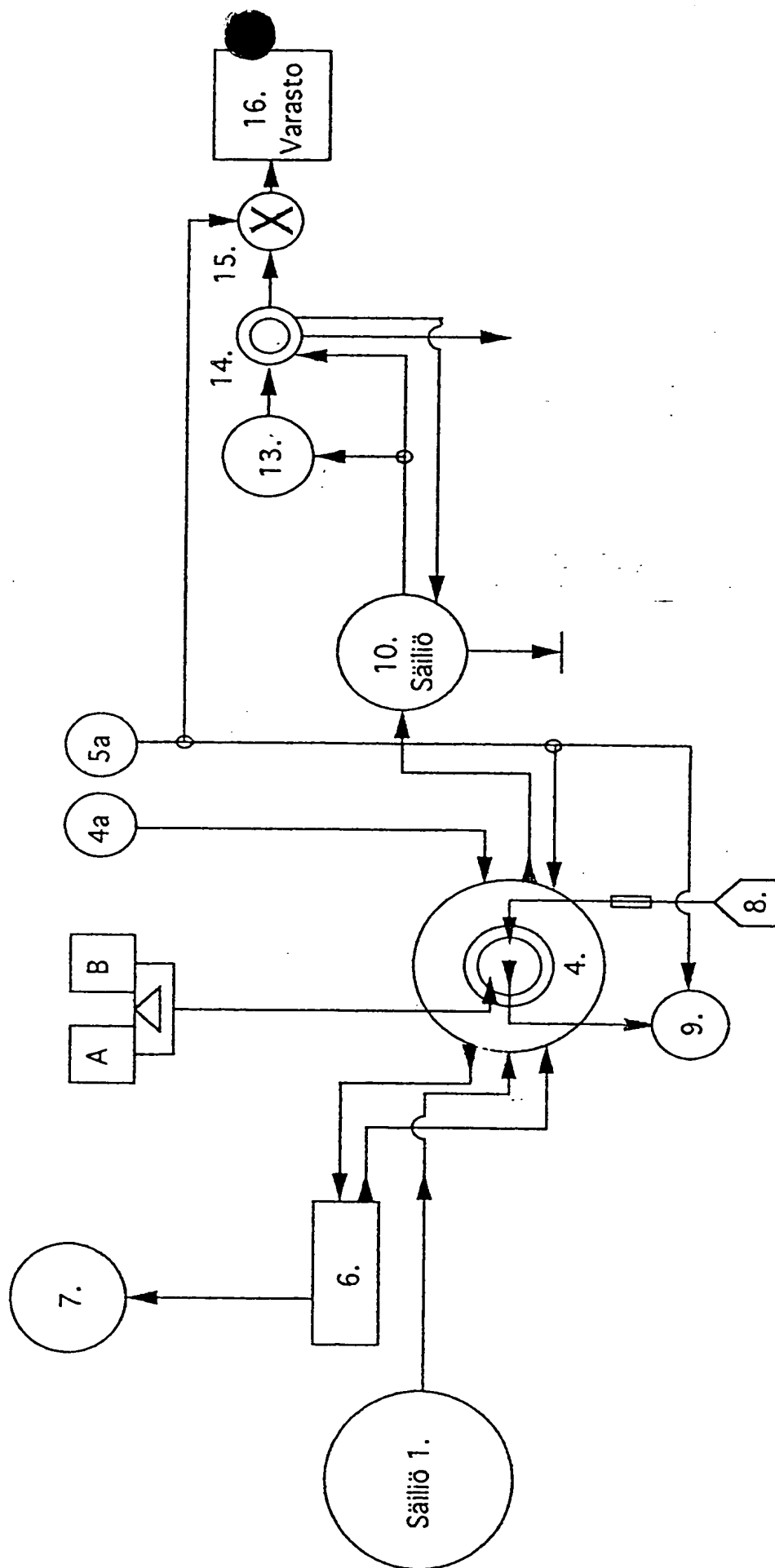
- de i utfällningen eller i filtratet efter separeringen befintliga och vid nämnda pH lösliga sulfonerade proteinernas (t.ex.  $\beta$ -laktoglobulin) tillvaratagning, företrädesvis genom ultrafiltrering, och eventuell vidarebehandling, såsom koncentring, pH-reglering, tvättning, hydrolys och/eller torkning.

13. Process enligt något av patentkraven 8-12, kännetecknad av att steg c) innefattar en separering av de sulfonerade proteinerna ur den behandlade vasslan och varandra genom fraktionsutfällning vid flera sura pH, varvid i den första utfällningen den fällning, som bildas i det första sura pH och därmed innehåller de vid nämnda pH olösliga proteinerna, separeras, företrädesvis genom centrifugering och/eller mikrofiltrering, och tillvaratages, och med det i nämnda pH bildade vattenfasen, mao. filtratet eller ett koncentrat därav, innehållande i nämnda pH lösliga proteiner, utförs en andra utfällning vid ett annat surt pH, separeras och tillvaratages, osv., tills följande komponenter tagits till vara: de fällningar och proteiner, vilka motsvarar varje sura utfällnings-pH, samt den efter alla utfällningar kvarblivna vattenfasen som innehåller vid alla utfällnings-pH lösliga förblivna proteinerna, vilka kan isoleras genom koncentring och torkas.

14. Process enligt patentkrav 13, kännetecknad av att steg c) innefattar separering av de sulfonerade proteinerna genom utfällning i två eller tre sura, företrädesvis sjunkande pH, företrädesvis vid pH cirka 5,0, varvid t.ex. en väsentlig del av vasslans  $\alpha$ -laktalbumin utfaller, vid pH cirka 4,5, varvid t.ex. utfaller en väsentlig del av vasslans boskapsserumalbumin (BSA), och vid pH cirka 4,0, varvid t.ex. utfälles resten av boskapsserumalbuminet och de övriga i surt medium utfallande proteiner, i nämnda ordning, varvid kvar blir en vattenfas, mao. den del av den behandlade vasslan, som innehåller proteiner, t.ex.  $\beta$ -laktoglobulin, som förblivit lösliga i nämnda tre utfällnings-pH.

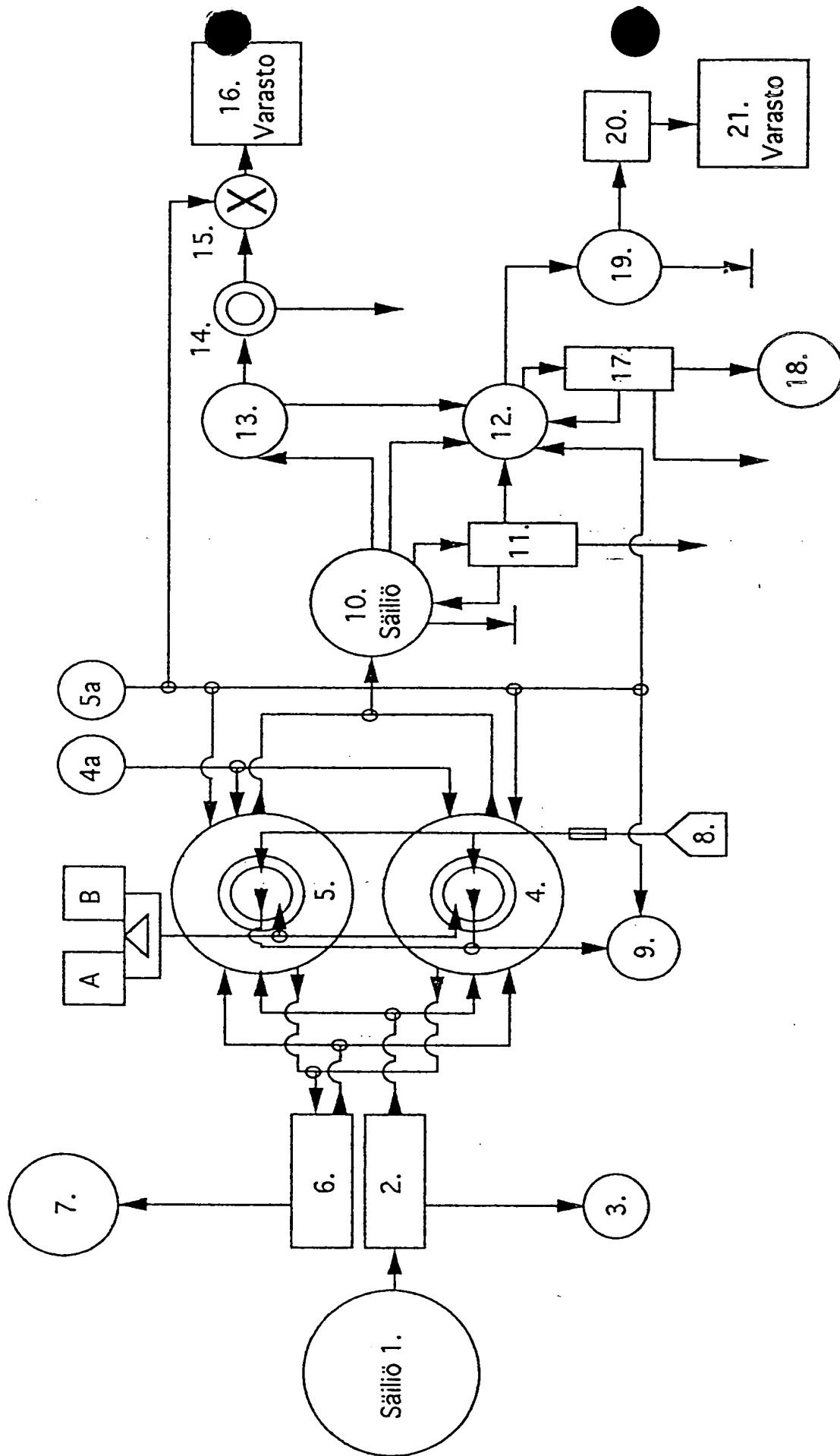


Heraproteiinien eristys ja käsittely: ydinprosessi





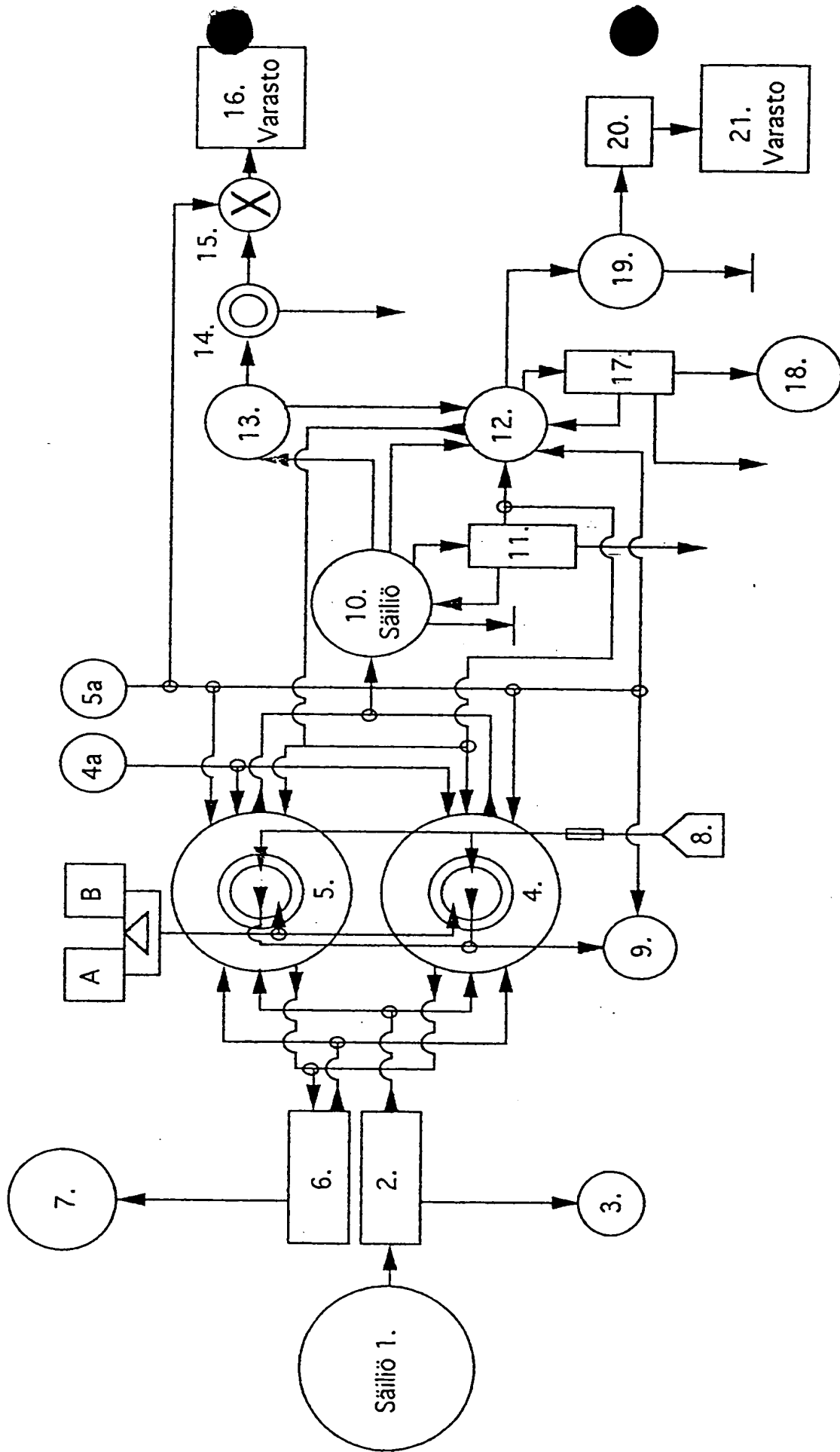
# Heraproteiinien eristys ja käsittely: ydinprosessi ja ensimmäinen laajennus







Heraproteiinien eristys ja käsittely: ydinprosessi  
sekä ensimmäinen ja toinen laajennus





1. Har  
 2. Har  
 3. Har  
 4. Har  
 5. Har  
 6. Har  
 7. Har  
 8. Har  
 9. Har  
 10. Har  
 11. Har  
 12. Har  
 13. Har  
 14. Har  
 15. Har  
 16. Har  
 17. Har  
 18. Har  
 19. Har  
 20. Har  
 21. Har  
 22. Har  
 23. Har  
 24. Har  
 25. Har  
 26. Har  
 27. Har  
 28. Har  
 29. Har  
 30. Har  
 31. Har  
 32. Har  
 33. Har  
 34. Har  
 35. Har  
 36. Har  
 37. Har  
 38. Har  
 39. Har  
 40. Har  
 41. Har  
 42. Har  
 43. Har  
 44. Har  
 45. Har  
 46. Har  
 47. Har  
 48. Har  
 49. Har  
 50. Har  
 51. Har  
 52. Har  
 53. Har  
 54. Har  
 55. Har  
 56. Har  
 57. Har  
 58. Har  
 59. Har  
 60. Har  
 61. Har  
 62. Har  
 63. Har  
 64. Har  
 65. Har  
 66. Har  
 67. Har  
 68. Har  
 69. Har  
 70. Har  
 71. Har  
 72. Har  
 73. Har  
 74. Har  
 75. Har  
 76. Har  
 77. Har  
 78. Har  
 79. Har  
 80. Har  
 81. Har  
 82. Har  
 83. Har  
 84. Har  
 85. Har  
 86. Har  
 87. Har  
 88. Har  
 89. Har  
 90. Har  
 91. Har  
 92. Har  
 93. Har  
 94. Har  
 95. Har  
 96. Har  
 97. Har  
 98. Har  
 99. Har  
 100. Har  
 101. Har  
 102. Har  
 103. Har  
 104. Har  
 105. Har  
 106. Har  
 107. Har  
 108. Har  
 109. Har  
 110. Har  
 111. Har  
 112. Har  
 113. Har  
 114. Har  
 115. Har  
 116. Har  
 117. Har  
 118. Har  
 119. Har  
 120. Har  
 121. Har  
 122. Har  
 123. Har  
 124. Har  
 125. Har  
 126. Har  
 127. Har  
 128. Har  
 129. Har  
 130. Har  
 131. Har  
 132. Har  
 133. Har  
 134. Har  
 135. Har  
 136. Har  
 137. Har  
 138. Har  
 139. Har  
 140. Har  
 141. Har  
 142. Har  
 143. Har  
 144. Har  
 145. Har  
 146. Har  
 147. Har  
 148. Har  
 149. Har  
 150. Har  
 151. Har  
 152. Har  
 153. Har  
 154. Har  
 155. Har  
 156. Har  
 157. Har  
 158. Har  
 159. Har  
 160. Har  
 161. Har  
 162. Har  
 163. Har  
 164. Har  
 165. Har  
 166. Har  
 167. Har  
 168. Har  
 169. Har  
 170. Har  
 171. Har  
 172. Har  
 173. Har  
 174. Har  
 175. Har  
 176. Har  
 177. Har  
 178. Har  
 179. Har  
 180. Har  
 181. Har  
 182. Har  
 183. Har  
 184. Har  
 185. Har  
 186. Har  
 187. Har  
 188. Har  
 189. Har  
 190. Har  
 191. Har  
 192. Har  
 193. Har  
 194. Har  
 195. Har  
 196. Har  
 197. Har  
 198. Har  
 199. Har  
 200. Har  
 201. Har  
 202. Har  
 203. Har  
 204. Har  
 205. Har  
 206. Har  
 207. Har  
 208. Har  
 209. Har  
 210. Har  
 211. Har  
 212. Har  
 213. Har  
 214. Har  
 215. Har  
 216. Har  
 217. Har  
 218. Har  
 219. Har  
 220. Har  
 221. Har  
 222. Har  
 223. Har  
 224. Har  
 225. Har  
 226. Har  
 227. Har  
 228. Har  
 229. Har  
 230. Har  
 231. Har  
 232. Har  
 233. Har  
 234. Har  
 235. Har  
 236. Har  
 237. Har  
 238. Har  
 239. Har  
 240. Har  
 241. Har  
 242. Har  
 243. Har  
 244. Har  
 245. Har  
 246. Har  
 247. Har  
 248. Har  
 249. Har  
 250. Har  
 251. Har  
 252. Har  
 253. Har  
 254. Har  
 255. Har  
 256. Har  
 257. Har  
 258. Har  
 259. Har  
 260. Har  
 261. Har  
 262. Har  
 263.

